

*chimie
physique*

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE MONTPELLIER

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Joseph ATTIAS

PREMIÈRE THÈSE

Étude de l'hydrolyse de la phosphorylcholine

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le 23 Décembre 1963 devant la Commission d'examen

M. E. KAHANE Président

Mme H. COLSON-GUASTALLA

MM. C. CHALIN

J. JULLIEN

} Examineurs

N° D'ORDRE

313

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE MONTPELLIER

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Joseph ATTIAS

PREMIÈRE THÈSE

Étude de l'hydrolyse de la phosphorylcholine

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le 23 Décembre 1963 devant la Commission d'examen

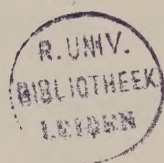
M. E. KAHANE Président

Mme H. COLSON-GUASTALLA

MM. C. CHALIN

J. JULLIEN

} Examineurs



FACULTÉ DES SCIENCES DE MONTPELLIER

Liste des Professeurs

DOYEN

B. CHARLES

ASSESSEURS

R. JOUTY

I. ASSENMACHER

DOYEN HONORAIRE

P. MATHIAS

PROFESSEURS HONORAIRES

R. JACQUES

J. SOULA

M. CASTERAS

G. DENIZOT

E. CARRIÈRE

J. GRANIER

E. TURRIÈRE

PROFESSEURS TITULAIRES

M. MOUSSERON

L. EMBERGER

Ch. BOUHET

P. MATHIAS

J.-P. ROIG

P. CHATELAIN

M^{lle} O. TUZET

M^{lle} G. CAUQUIL

J. SALVINIEN

G. COUCHET

M^{lle} A.M. VERGNOUX

J. AVIAS

P. VIELES

J. RABINOVITCH

E. KAHANE

J.J. MOREAU

B. CHARLES

J. MOTTE

R. JOUTY

C. CHALIN

I. ASSENMACHER

B. PISTOULET

Ch. ROUMIEU

A. POTIER

R. JACQUIER

R. LAFONT

J. FALGUEIRETTES

Chimie

Botanique

Physique

Zoologie et Biologie générale

Physique

Minéralogie et cristallographie

Zoologie et Biologie générale

Chimie

Chimie-Physique

Mécanique supérieure

Physique

Géologie

Chimie

Physique

Chimie biologique

Mécanique rationnelle

Mathématiques pures

Botanique

Physique

Physique

Physiologie animale

Physique

Mathématiques

Chimie minérale

Chimie

Physique

Minéralogie

PROFESSEUR TITULAIRE EN SURNOMBRE

M. BOUX

Mathématiques

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M ^{me} J. CHARLES	Mathématiques
M ^{me} M. DE POUQUES	Botanique
P. MURAOUR	Géophysique Appliquée
M ^{me} M. LAFON	Mathématiques
M. MATTAUER	Géologie
P. CAILLON	Physique
G. TOURNE	Chimie
L. EUZET	Zoologie
J. REMY	Géologie
M ^{me} G. VERNET	Biologie Animale
H. ANDRILLAT	Astronomie
P. DEMANGEON	Géologie
Ch. SAUVAGE	Botanique
A. BONNET	Botanique
J. ROUZAUD	Chimie

MAITRES DE CONFÉRENCES

H. CHRISTOL	Chimie
E. GROUBERT	Physique
M ^{me} H. COLSON-GUASTALLA	Biologie Physico-Chimique
J. P. LAFON	Mathématiques
A. STEINER	Psychophysiologie
G. LAMATY	Chimie
C. DELOUPY	Physique
L. GRAMBAST	Botanique
R. GAUFRES	Chimie
F. PROUST	Géologie
A. BASSOMPIERRE	Physique
A. MARTINEAU	Mathématiques
M. SAVELLI	Physique
J. PARIS (C.S.U.)	Zoologie
M ^{me} DUBOUL-RAZAVET (C.S.U.)	Géologie
R. MARTY	Physiologie Animale
R. BOURDU	Botanique
M. MAURIN	Chimie
J. SOULIER (C.S.U.)	Chimie

CHARGÉS D'ENSEIGNEMENT

M. LEFRANC	Mathématiques
A. STURER	Mathématiques
M ^{lle} A. BAILLETTE	Mathématiques
P. MOLINO (C.S.U.)	Mathématiques

SECRETAIRE PRINCIPAL

E. SIAU

A mon Maître,

Monsieur Ernest KAHANE.

A mes parents,
A tous les miens,
A mes amis.

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé dans le Service de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Montpellier, sous la direction de Monsieur le professeur Ernest Kahane. Je voudrais exprimer ici à mon maître ma profonde et respectueuse gratitude pour m'avoir accueilli dans son laboratoire après mes études de licence. Je lui suis particulièrement reconnaissant des riches enseignements qu'il m'a toujours dispensés avec autorité, intelligence et rigueur.

Madame H. Colson-Guastalla, maître de Conférences, a suivi avec attention et sollicitude le déroulement de ce travail, en me faisant profiter de sa grande expérience en Chimie physique. Je tiens à la remercier pour les longs moments qu'elle m'a consacrés.

Monsieur le professeur C. Chalin, qui fut l'un de mes Maîtres au Laboratoire de Physique de l'Institut des Hautes de Tunis (Université de Paris), m'a fait le grand honneur d'accepter de faire partie du jury de cette thèse. Je le remercie des conseils avisés qu'il m'a donnés pour l'élaboration du second sujet.

Monsieur le professeur J. Jullien m'a témoigné à plusieurs reprises tout l'intérêt qu'il portait à la cinétique d'hydrolyse des esters phosphoriques. Je le remercie vivement d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Je remercie mes collègues et le personnel des Services de Chimie biologique et de Biologie physico-chimie biologique qui ont su entretenir un climat d'amitié et un esprit de collaboration qui ont rendu ma tâche plus aisée.

Je remercie enfin Monsieur le professeur J. Roche d'avoir accepté de parrainer mon travail de recherche et le Centre National de la Recherche Scientifique qui a permis, en m'acceptant dans ses cadres, la réalisation matérielle de ce travail.

INTRODUCTION

La phosphorylcholine $+N(CH_3)_3 CH_2 CH_2 O PO_3 H_2$, ester ortho-phosphorique de la choline, est un constituant biologique dont la présence dans les tissus les plus variés semble être établie. Du fait qu'elle constitue une partie de la molécule de certains phosphatides (lécithines, plasmalogènes, sphingomyélines), c'est principalement dans le métabolisme de ces lipides que sa formation a été d'abord recherchée.

La phosphorylcholine se trouve à l'état libre dans certains tissus, sa présence peut s'expliquer par hydrolyse enzymatique partielle des phospholipides à choline, sous l'influence d'une enzyme spécifique, la phospholipase C.

Il est beaucoup plus important de savoir, si inversement, la phosphorylcholine participe à l'édification de la molécule de phosphatide, si elle est ou non un anabolite.

Lorsqu'on injecte du phosphate ou de la choline marqués à un animal, on observe une incorporation relativement rapide de ces substances dans les phospholipides de différents tissus [23]. Par contre, l'injection de phosphorylcholine marquée montre que cette substance est rapidement hydrolysée *in vivo*.

Le mécanisme de la synthèse des phospholipides reçut son explication à la suite des travaux de Kennedy et de ses collaborateurs [23] qui montrèrent que le précurseur immédiat des phospholipides à choline est la cytidine-diphosphate-choline (CDP-choline). Cette substance permet de réaliser la synthèse de ces lipides en présence d'enzymes hautement spécifiques et des substrats correspondants, en cédant une molécule de phosphorylcholine.

Le processus de synthèse peut se résumer comme suit :

Dans une première étape la phosphorylcholine (PC) est synthétisée *in situ* par phosphorylation de la choline en présence du couple ATP-ADP et de l'enzyme correspondante, la choline-phosphokinase.



Elle réagit ensuite avec le cytidine-triphosphate (CTP) pour donner, en présence de la phosphorylcholine-cytidyl-transférase, la CDP-choline et du pyrophosphate (PP).



Enfin, la CDP-choline, en réagissant sur certains substrats particuliers et en présence d'enzymes spécifiques, donne selon les cas les lécithines, les plasmalogènes ou les sphingomyélines, et du cytidine-monophosphate (CMP).

Ainsi apparaît le rôle fondamental de la phosphorylcholine dans la biosynthèse des phospholipides.

Du point de vue de ses propriétés chimiques, la phosphorylcholine présente une grande stabilité vis-à-vis des agents hydrolysants alcalins et acides. Les données fragmentaires de la littérature indiquent que son hydrolyse est nulle en milieu alcalin après 24 heures à 100°C en milieu NaOH N [54], ou après 100 heures à 100°C en milieu NaOH 2N [2]. Plimmer et Burch [54] obtiennent 19,5 % d'hydrolyse en 9 heures à 100°C en milieu HCl N, tandis que Baer et Mac Arthur [2] obtiennent 20 % d'hydrolyse dans les mêmes conditions.

La phosphorylcholine est à cet égard beaucoup plus stable que les autres esters de la choline, acétylcholine [33], sulfurylcholine, lécithines.

Elle est très résistante aux agents oxydants. Le mélange nitrosulfurique ne la détruit que faiblement, il faut utiliser l'acide perchlorique pour la minéraliser. Le permanganate en milieu alcalin n'exerce également aucune influence, alors que la choline est rapidement oxydée avec formation de triméthylamine.

Elle est hydrolysée lentement par les diverses phosphatases acides [63], par contre elle l'est rapidement par les phosphatases alcalines du cerveau, du rein et du sérum. Elle n'est pas hydrolysée par les choline-estérases [2].

Le rôle important que joue la phosphorylcholine dans le métabolisme des phospholipides nous a conduit à étudier le comportement de cette substance à l'égard de l'hydrolyse non enzymatique. Nous avons effectué l'étude cinétique de cette hydrolyse dans un large domaine de pH afin de déterminer les variations de la vitesse d'hydrolyse en fonction de l'acidité du milieu, et nous avons envisagé l'étude de l'influence de différents facteurs physico-chimiques.

En vue de déterminer les domaines d'existence des différentes formes ioniques de la phosphorylcholine, nous avons établi sa courbe de titrage.

Le second but que nous nous sommes proposé dans ce travail, est l'étude de l'influence de divers ions métalliques sur la vitesse d'hydrolyse de la phosphorylcholine.

Cette étude nous a été suggérée par le fait que de nombreuses réactions enzymatiques, et en particulier phosphatasiques, sont fortement influencées par des ions métalliques qui agissent comme activateurs ou comme inhibiteurs.

Nous avons voulu examiner quelle était l'influence de certains de ces ions sur l'hydrolyse non enzymatique de la phosphorylcholine avant d'aborder, dans un travail ultérieur, l'étude de leur influence sur la réaction enzymatique.

L'activation de certaines réactions non enzymatiques par des ions métalliques est généralement attribuée à la formation de complexes entre le substrat et ces ions métalliques. C'est pourquoi, en vue d'essayer de mettre en évidence une telle formation de complexes, nous avons étudié les courbes de titrage de la phosphorylcholine en présence de divers ions métalliques.

Le plan que nous avons adopté pour l'exposé de cette thèse est le suivant :

Première partie : Généralités.

Chapitre 1 : L'hydrolyse des esters phosphoriques.

Chapitre 2 : Techniques expérimentales.

Deuxième partie : Dissociation de la phosphorylcholine.

Chapitre 1 : Constantes de dissociation.

Chapitre 2 : Courbes de titrage en présence d'ions métalliques.

Troisième partie : Hydrolyse de la phosphorylcholine.

Chapitre 1 : Cinétique d'hydrolyse.

Chapitre 2 : Hydrolyse en présence d'ions métalliques.

PREMIÈRE PARTIE

GÉNÉRALITÉS

CHAPITRE PREMIER

L'HYDROLYSE DES ESTERS PHOSPHORIQUES

I. — INFLUENCE DU pH.

L'hydrolyse des monoesters orthophosphoriques d'alcools est caractérisée par le profil en « cloche » de la courbe des vitesses d'hydrolyse en fonction du pH. La vitesse d'hydrolyse, notable en milieu fortement acide, passe par un minimum vers pH 0,5, puis elle augmente jusque vers pH 4 pour pratiquement s'annuler en milieu alcalin au-dessus de pH 8,0 environ.

La réaction est du premier ordre, sauf en milieu fortement acide, où elle est en général acido-catalysée et présente de ce fait une cinétique du second ordre.

Un monoester orthophosphorique peut exister sous différentes formes ioniques :

- une forme neutre ROPO_3H_2 ,
- une forme mono-ionisée ROPO_3H^- ,
- une forme di-ionisée ROPO_3^{--} .

On admet de plus qu'il peut exister, en milieu fortement acide, une forme acide conjuguée par protonisation de sites spécifiques de la molécule d'ester [14].

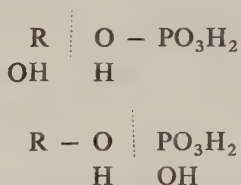
Il est désormais établi que le pH optimum d'hydrolyse correspond sensiblement au pH de neutralisation de la première fonction acide, tandis que le pH au-dessus duquel l'hydrolyse est nulle correspond au pH de neutralisation de la deuxième fonction acide.

Bailly [3] et Desjobert [24] attribuèrent le phénomène observé au fait que la forme mono-ionisée possède une vitesse d'hydrolyse notable, comparée aux vitesses d'hydrolyse des formes neutre et di-ionisée. De nombreux travaux ultérieurs confirmèrent cette hypothèse et établirent qu'entre pH 2 et pH 8 environ, la vitesse d'hydrolyse est effectivement proportionnelle à la concentration de la forme mono-ionisée ROPO_3H^- [14, 17 à 19]. Par contre, en dessous de pH 2 environ, alors que la vitesse d'hydrolyse calculée décroît régulièrement en fonction de la concentration de la forme mono-ionisée, on observe expérimentalement que la vitesse passe par un minimum vers pH 0,5, pour augmenter en milieu fortement acide. Cette dernière propriété est attribuée à l'existence d'une réaction acido-catalysée faisant intervenir une forme acide conjuguée de l'ester.

En ce qui concerne la stabilité en milieu alcalin, on peut l'expliquer par des considérations purement électrostatiques. En effet, à pH 8, l'ester se trouve pratiquement totalement sous forme dinégative ROPO_3^- , la forte charge négative de cet ion exerce une répulsion sur les ions OH^- qui sont dans ce cas les agents hydrolysants et empêchent ainsi l'attaque du site réactionnel, c'est-à-dire l'atome de phosphore, par ces ions.

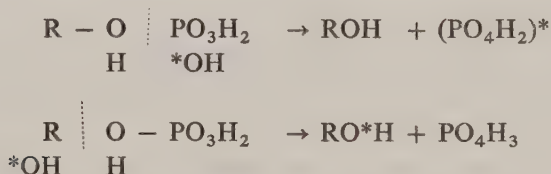
II. — LIAISONS ROMPUES.

Si on considère un monoester orthophosphorique d'alcool $\text{R-O-PO}_3\text{H}_2$, la scission hydrolytique en orthophosphate et alcool de la molécule peut se produire par rupture de la liaison C-O ou de la liaison P-O, selon les schémas suivants :



Il est intéressant dans certains cas de connaître quelle est la liaison qui se rompt au cours de l'hydrolyse.

La méthode classique pour déterminer les sites de rupture consiste à effectuer l'hydrolyse dans de l'eau enrichie en oxygène-18. La présence de cet isotope dans l'alcool ou dans l'orthophosphate résultant de l'hydrolyse, indiquera suivant le cas, une rupture C-O ou une rupture P-O.



Les nombreux travaux effectués par cette méthode montrent qu'à pH 4, on obtient des alcools isotopiquement normaux et un orthophosphate dans lequel un des atomes d'oxygène est marqué, ce qui indique une rupture de la liaison P-O. Ce type de rupture a été démontré pour de nombreux esters phosphoriques [14, 58]. Les quinol-phosphates, qui procèdent par la scission simultanée des liaisons C-O et P-O [41], semblent constituer une exception. Butcher et Westheimer [15] ont utilisé une autre méthode; partant d'un ester optiquement actif, le mono-2-méthoxy-1-méthyl-éthyl-phosphate, les auteurs ont montré que cet ester est hydrolysé à pH 4 avec rétention complète de configuration, ce qui indique la rupture de la liaison

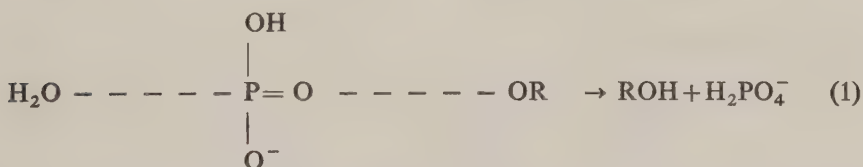
P-O. En milieu fortement acide, on observe une racémisation de l'alcool, donc une rupture de la liaison C-O. Bunton et ses collaborateurs [14] ont montré que la forme mono-ionisée du monométhyl-phosphate s'hydrolyse avec rupture de la liaison P-O, tandis que l'hydrolyse de l'acide conjugué se produit à la fois avec rupture des liaisons P-O et C-O. La connaissance de ces sites de rupture présente un grand intérêt pour l'interprétation des mécanismes de réaction.

III. — MÉCANISMES DE RÉACTION.

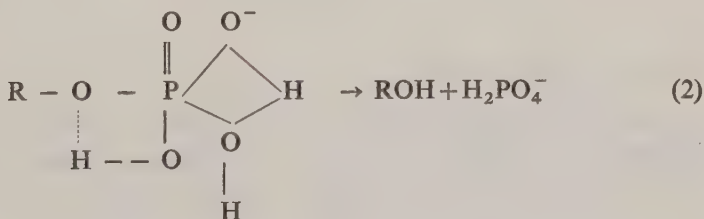
A) Hydrolyse de la forme mono-ionisée

Les mécanismes réactionnels proposés pour l'hydrolyse des esters phosphoriques doivent donc faire intervenir la rupture de la liaison P-O puisque celle-ci a été démontrée dans les cas typiques où elle a été étudiée; d'autre part, cette rupture devra porter exclusivement sur la forme mono-ionisée. Malgré la simplicité de la réaction, plusieurs hypothèses sont avancées, aucune d'elles n'est définitive.

Selon Chanley [19] l'hydrolyse des esters phosphoriques résulterait d'une attaque nucléophile de l'atome de phosphore par l'eau.

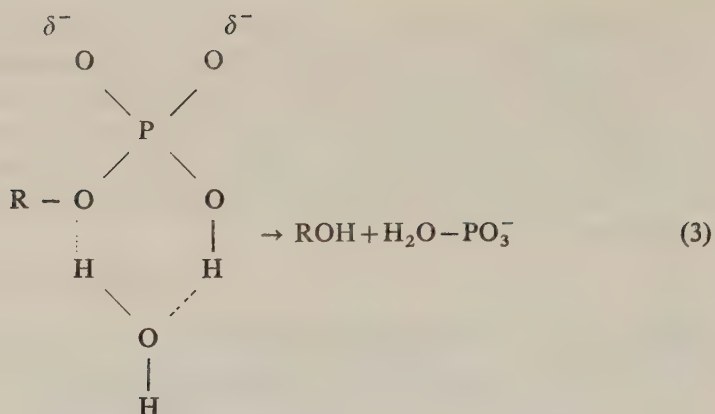


Vernon [67] propose pour cette réaction un modèle plus explicite figuré par le schéma 2 :



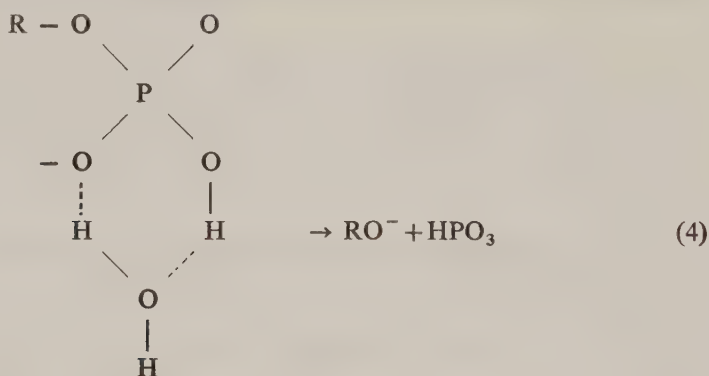
Dans ces deux hypothèses, les produits d'hydrolyse sont l'alcool et l'orthophosphate.

Butcher et Westheimer [15] considèrent par contre qu'il se forme un composé intermédiaire eau-ester dans lequel une molécule d'eau se trouve liée à une molécule d'ester par des liaisons hydrogène.

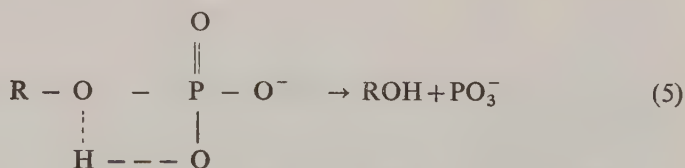


Les produits d'hydrolyse sont l'alcool et l'ion métaphosphate instable qui donne rapidement un orthophosphate en présence d'eau.

Vernon [67] s'appuyant sur une hypothèse du même genre, propose une structure différente pour le composé eau-ester, faisant intervenir directement la charge négative de l'oxygène dans la liaison hydrogène. Le mécanisme proposé implique la formation d'un ion alcoolate et d'acide métaphosphorique (schéma 4) :



Il est possible, ainsi que le signale Vernon [67], que le mécanisme consiste en une lente hétérolyse, dans laquelle l'hydrogène d'un des hydroxyles est transféré sur l'oxygène de la liaison P-O :



Ce mécanisme est cependant peu séduisant, parce qu'il ne fait pas intervenir explicitement l'eau en tant qu'espèce réagissante. Les mécanisme (3) et (4)

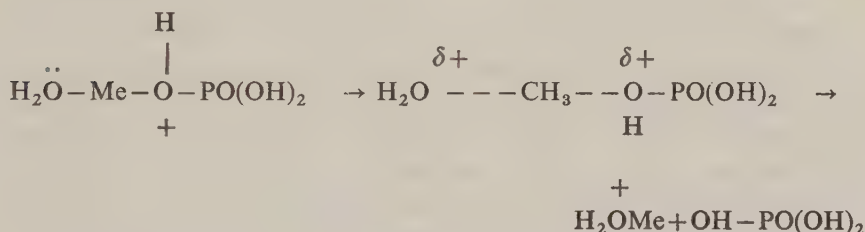
ne sont pas incompatibles avec le fait qu'on n'ait pas pu mettre en évidence la présence d'acide métaphosphorique ou de métaphosphate, du fait de leur recombinaison rapide avec l'eau pour donner un orthophosphate.

B) Hydrolyse en milieu acide

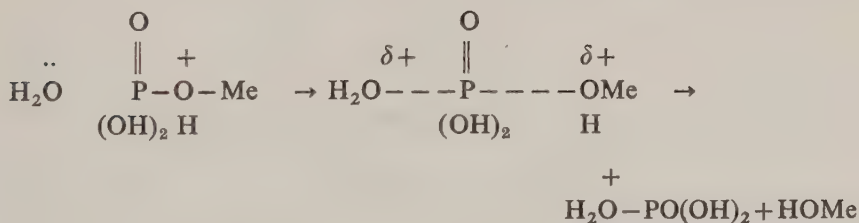
En milieu fortement acide, l'hydrolyse semble procéder par l'intermédiaire d'une forme acide conjuguée de l'ester et l'on observe à la fois la rupture des liaisons C-O et P-O.

D'après Vernon [67] l'hydrolyse acide du monométhylphosphate résulterait d'une attaque nucléophile par l'eau sur l'atome de carbone (rupture C-O) ou sur l'atome de phosphore (rupture P-O) selon les mécanismes suivants :

a) Rupture C-O.



b) Rupture P-O.



Dans le cas de la rupture C-O, les produits formés sont l'orthophosphate et l'acide conjugué de l'alcool ROH_2^+ , tandis que dans le cas de la rupture P-O les produits de la réaction sont un acide orthophosphorique conjugué et l'alcool.

C) Hydrolyse en milieu alcalin

L'hydrolyse en milieu alcalin peut devenir importante lorsqu'il existe en position β du carbone porteur de la fonction phosphorique un groupement attracteur d'électrons tels que $\text{C} \equiv \text{N}$, CONH_2 , COOH ou COOR [21].

D'après Lapidot [42] l'hydrolyse procéderait dans ce cas par un mécanisme de β élimination avec formation d'un dérivé éthylénique et rupture de la liaison C-O. Ce sont là des cas particuliers dûs à la nature des fonctions portées par la chaîne carbonée.

Il faut souligner la forte influence qu'exerce la structure de la chaîne carbonée sur l'hydrolyse des esters phosphoriques. Pour une étude détaillée de ces influences, nous préférons renvoyer le lecteur aux nombreux articles parus sur la question [59].

D'une manière générale, il semble que tout substituant ayant pour effet d'augmenter la charge positive partielle de l'atome de phosphore, active la vitesse d'hydrolyse.

IV. — ÉNERGIE DES LIAISONS.

Du point de vue de la biochimie, un des aspects les plus importants concernant l'hydrolyse des esters phosphoriques est son aspect énergétique.

Lipmann [46] classe les esters phosphoriques en deux catégories distinctes d'après la valeur de la variation d'enthalpie libre ΔG° qui accompagne leur hydrolyse. Lorsque ΔG° est voisin de $-3\,000$ cal/mole, la liaison phosphorique est dite pauvre en énergie; lorsque ΔG° est voisin de $-12\,000$ cal/mole, la liaison est dite riche en énergie. En fait, la distinction entre ces catégories n'est pas aussi nettement tranchée, car on observe quelques dérivés phosphorés qui présentent des valeurs de ΔG° intermédiaires. Si la réaction d'hydrolyse est une réaction d'équilibre :



et si l'on désigne par K la constante d'équilibre, on a la relation :

$$\Delta G^\circ = -RT \log K \quad (7)$$

La connaissance de K permet ainsi de déterminer ΔG° , et réciproquement.

Pour que l'équilibre (6) soit expérimentalement mesurable, les valeurs de ΔG° doivent être supérieures à $-5\,000$ cal/mole. Lorsqu'il en est ainsi, la méthode classique des déplacements d'équilibres est alors applicable et peut fournir une valeur de K, donc de ΔG° . Cette méthode a été appliquée par Kay [34] dans le cas du glycérophosphate. Afin d'opérer rapidement et à basse température, l'hydrolyse est réalisée par voie enzymatique.

Signalons également la méthode au phosphore marqué, utilisée par du Ginodman [29] pour l'hydrolyse du glycérophosphate et du glucose-6-phosphate.

Dans le cas des esters à liaison riche en énergie, les méthodes d'équilibres ne sont pas applicables pour le calcul de ΔG° . Il faut avoir recours à des données relatives à d'autres réactions faisant intervenir la réaction considérée. C'est en particulier le cas de la détermination de ΔG° pour l'adénosine triphosphate [50, 51], le phosphoénolpyruvate [47], l'acétylphosphate [13] et le créatine-phosphate [43].

La détermination des chaleurs d'hydrolyse, d'autre part, présente une grande importance pour la détermination des variations d'entropie d'hydrolyse.

CHAPITRE II

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

I. — PRODUITS ÉTUDIÉS.

Nous avons disposé principalement de deux sels cristallisés de phosphorylcholine* : le choline-phosphate de magnésium et le chlorure de choline-phosphate de calcium, ainsi que d'un échantillon d'acide cristallisé, préparés par le laboratoire de recherches des Établissements Lematte et Boinot que nous remercions pour nous les avoir gracieusement fournis.

A) *Choline-phosphate de magnésium*

C'est une poudre blanche cristallisée, très soluble dans l'eau. Son analyse élémentaire montre que la molécule contient deux radicaux de PC pour un Mg et correspond à la formule $[^+N(CH_3)_3CH_2CH_2OPO_3H^-]_2Mg, 14 H_2O$ (P. M. = 640).

Composition centésimale :

Calcul :	N : 4,37 %	P : 9,65 %	Mg : 3,80 %
Analyse :	N : 4,37 %	P : 9,60 %	Mg : 3,93 %

B) *Chlorure de choline-phosphate de calcium*

C'est une poudre blanche soluble dans l'eau. Sa composition chimique correspond à la formule $ClN(CH_3)_3CH_2CH_2OPO_3Ca, 4 H_2O$ (P. M. = 329,5).

Composition centésimale :

Calcul :	Cl : 10,77 %	P : 9,41 %	N : 4,26 %	Ca : 12,10 %
Analyse :	Cl : 10,64 %	P : 9,30 %	N : 4,25 %	Ca : 12,10 %

C) *Acide choline-phosphorique cristallisé*

C'est une poudre blanche très soluble dans l'eau.

Composition centésimale :

Calcul :	C : 28,58 %	H : 8,09 %	N : 6,68 %	P : 14,78 %
Analyse :	C* : 28,70 %	H* : 8,17 %	N : 6,68 %	P : 14,78 %

* Dans tout ce qui suit nous désignons la phosphorylcholine par le symbole PC.

★ Service Central de Microanalyse du C.N.R.S., division de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier.

Sa composition chimique correspond à la formule :



Le pH de ses solutions est voisin de 3,6.

Les charges de signes opposés présentes aux deux extrémités de la molécule s'attirent fortement et peuvent créer ainsi une liaison saline interne. En solution aqueuse, on peut assister à l'ionisation de cette liaison, la PC se présente alors sous forme d'ion dipolaire.

II. — PRÉPARATION DE L'ACIDE CHOLINE-PHOSPHORIQUE EN SOLUTION.

Le principe de préparation que nous avons adopté consiste à échanger les ions métalliques d'un sel de PC avec des ions H^+ en faisant passer une solution de ce sel sur une colonne de résine échangeuse de cations. Nous avons utilisé successivement le sel de magnésium et le sel de calcium que nous venons de décrire.

A) *Choline-phosphate de magnésium*

Dans un tube de verre de 30 mm de diamètre, muni d'un robinet, nous introduisons une résine échangeuse de cations (Dowex 50) sur une hauteur de 25 centimètres.

La résine est traitée par l'acide chlorhydrique 4N et rincé abondamment avec de l'eau distillée jusqu'à pH neutre. Cette opération a pour but de régénérer la résine et de la saturer en ions H^+ .

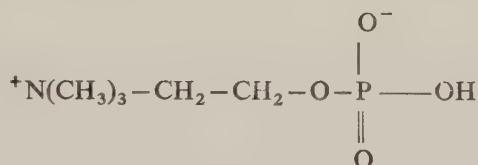
On fait alors passer sur la colonne une solution de choline-phosphate de magnésium (70 g dissous dans 300 ml d'eau) au moyen d'une ampoule fixée au sommet de la colonne. Les premières fractions sont éliminées et dès que l'effluent devient acide (virage de l'hélianthine) on recueille la solution, jusqu'à épuisement du liquide dans l'ampoule. La solution est repassée plusieurs fois sur la colonne; on lave ensuite avec de l'eau distillée et l'on recueille l'effluent jusqu'à pH neutre.

La solution d'acide choline-phosphorique ainsi obtenue est exempte de magnésium, déterminable au jaune thiazol. Le pH de cette solution est voisin de 3,6. Il est égal à celui des solutions d'acide choline-phosphorique cristallisé que nous avons décrit plus haut.

Il est important de noter la valeur anormalement élevée du pH des solutions d'acide choline-phosphorique. On sait en effet que les esters phosphoriques sont des acides plus forts que l'acide orthophosphorique.

On doit donc s'attendre à des valeurs relativement basses du pH des solutions d'acide libre de ces esters. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons préparé par le même procédé, des solutions d'acide phosphorique et d'acides α et β glycérophosphoriques, à partir de leurs sels de sodium*. Les solutions recueillies avaient, dans chacun des cas, des pH compris entre 1 et 2 et leurs courbes de titrage coïncident avec celles données dans la littérature.

Cette expérience montre donc que le pH observé pour les solutions de PC est bien celui de l'acide libre. La valeur relativement élevée de ce pH s'explique facilement par le fait que la PC, se trouve dans ces conditions sous forme dipolaire :



B) Chlorure de choline-phosphate de calcium

Lors du passage d'une solution de ce sel sur la résine cationique, la présence des ions Cl^- a pour effet d'acidifier fortement la solution effluente par suite de la formation d'acide chlorhydrique. Comme on peut le prévoir, les ions Ca^{++} sont intégralement retenus sur la résine, les ions Cl^- sont rapidement recueillis, par contre on constate que la PC est retenue en forte proportion (60 à 70 %). Si l'on poursuit l'élution avec de l'eau distillée, on observe un passage massif de la PC dès que le pH des solutions atteint 3 à 4 (figure 1).

Ces résultats s'interprètent facilement si l'on considère qu'en dessous de pH 3,6 la PC existe sous la forme $^+\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$, c'est-à-dire sous forme cationique. Cette forme est en équilibre d'ionisation avec la forme dipolaire, c'est pourquoi une partie de la PC n'est pas retenue sur la colonne, tandis que l'autre partie se trouve retenue comme un cation ordinaire. A mesure que le pH augmente, par suite de l'élimination de l'acide chlorhydrique, la concentration de cette forme diminue au profit de celle de la forme dipolaire. Lorsque cette concentration est maximale, la PC ne se trouve pratiquement plus retenue sur la résine.

* Nous remercions les laboratoires O. Bailly pour nous avoir aimablement fourni les α et β glycérophosphates de sodium.

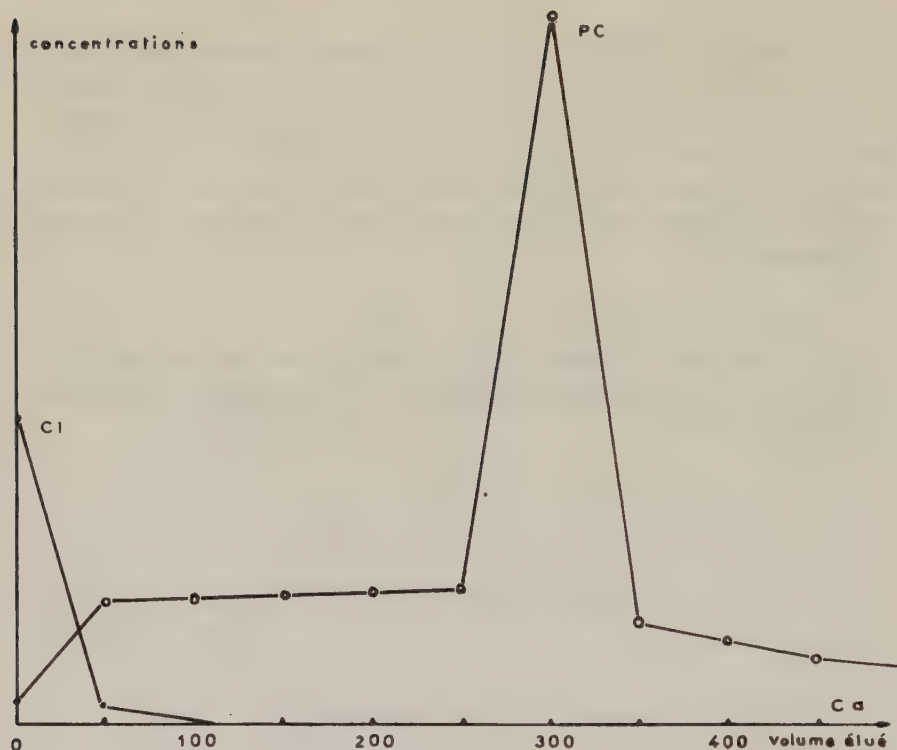


Fig. 1. — Élu­tion par l'eau du chlorure de choline-phosphate de calcium, sur résine Dowex-50.

Ces expériences montrent donc manifestement le caractère dipolaire de la PC en solution à pH 3,6. Des preuves supplémentaires de cette structure seront apportées par l'étude de sa courbe de titrage. Comme nous le verrons, le pH de neutralisation de la première acidité est précisément égal à 3,6.

III. — PRÉPARATION DU SEL DE SODIUM EN SOLUTION.

Nous avons préparé le sel de sodium en solution par échange d'ions en faisant passer une solution de choline-phosphate de magnésium sur une colonne de résine cationique Dowex 50 sous forme sodique.

Le dispositif chromatographique est le même que celui utilisé pour la préparation de l'acide. Après traitement par de l'acide chlorhydrique 4N et lavage à l'eau distillée, la résine est saturée en ions sodium. Pour cela, on fait passer sur la résine une solution de chlorure de sodium à 10 %

jusqu'à disparition des ions H^+ dans la solution effluente. La colonne est ensuite lavée à l'eau distillée jusqu'à disparition des ions Cl^- .

Lors du passage de la solution de choline-phosphate de magnésium, les ions Mg^{++} sont échangés avec les ions Na^+ et l'on obtient une solution de choline-phosphate de sodium. Le pH de cette solution est voisin de 8,0. Nous n'avons pas isolé ce sel mais sa présence en solution est indiscutable. En effet :

1° La solution est rigoureusement exempte de magnésium (jaune thiazol).

2° La quantité d'acide ajoutée entre les deux points équivalents de la courbe de titrage de la solution obtenue correspond exactement au titre de la solution du sel de sodium.

IV. — MÉTHODES ANALYTIQUES.

Du point de vue analytique, la molécule de $PC^+N(CH_3)_3CH_2CH_2OPO_3H_2$, a l'avantage de présenter deux groupements caractéristiques (choline et phosphate) qui possèdent des propriétés analytiques particulières quand ils sont séparés et qui ne se révèlent pas dans la molécule de PC.

1° Dosage de la PC.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de techniques analytiques spécifiques permettant de doser directement la PC. La seule méthode, consistera donc à doser l'azote ou le phosphore après minéralisation.

2° Dosage de l'azote.

L'azote est minéralisé à l'état d'ions NH_4^+ par la méthode classique de Kjeldahl. On utilise un catalyseur à base de $CuSO_4$ et K_2SO_4 (1/3 en poids), en présence d'acide sulfurique concentré. Le dosage de l'ammoniaque formée est effectué par acidimétrie après entraînement à la vapeur dans l'appareil de Parnas et Wagner.

3° Dosage du phosphore.

a) Phosphore total. Le phosphore organique est minéralisé par attaque sulfo-nitro-perchlorique [32].

A la solution à minéraliser on ajoute :

— 0,5 ml d'acide sulfurique concentré,

— 5 ml de mélange nitro-perchlorique et l'on porte à l'ébullition.

Au cours de l'attaque, les acides nitrique et perchlorique s'éliminent successivement. Le résidu sulfurique est additionné de quelques millilitres

d'eau et porté à 100° C pendant 15 minutes. Cette opération a pour but d'hydrolyser les pyrophosphates en orthophosphates.

La solution est amenée à un volume connu et l'orthophosphate dosé sur une partie aliquote.

b) Dosage de l'orthophosphate. Nous avons utilisé la méthode colorimétrique classique au bleu de molybdène suivant la technique de Machebœuf et Delsal [48].

Réactifs :

— Réactif molybdique : 25 g de molybdate d'ammonium sont dissous dans 300 ml d'eau, puis on ajoute successivement 75 ml d'acide sulfurique concentré et 125 ml d'eau.

— Hydroquinone à 1 % fraîchement préparée + 1 goutte d'acide sulfurique concentré.

— Sulfite de sodium à 20 %. Cette solution se conserve quelques jours.

A la solution d'orthophosphate, on ajoute dans l'ordre :

— 1 ml de réactif molybdique,

— 1 ml d'hydroquinone,

— 1 ml de sulfite.

En présence d'orthophosphate, il se développe une coloration bleue (complexe phosphomolybdo-molybdique). Les densités optiques sont lues au bout de vingt minutes au colorimètre à 580 mμ.

Une courbe d'étalonnage, préalablement établie à l'aide d'une solution étalon de phosphate, permet de déterminer la quantité de phosphate dosée.

La solution étalon de phosphate est une solution de KH_2PO_4 à 4,394 g/l, diluée au 1/100 (10 γ de P/ml).

La méthode permet de doser des quantités de phosphore comprises entre 10 γ et 40 γ.

c) Dosage du phosphate en présence de PC. La PC ne donne aucune réaction colorée avec les réactifs indiqués. En outre, nous avons vérifié que la présence de PC n'influe pas sur la colorimétrie de l'orthophosphate. Cette propriété est en particulier applicable au dosage de solutions de PC partiellement hydrolysées sans avoir à extraire l'orthophosphate formé.

4° Dosage de la choline.

Une des méthodes les plus usuelles de dosage de la choline consiste à oxyder cette substance et à doser par acidimétrie la triméthylamine formée. Or la PC est résistante à l'action des oxydants même forts. On pourra donc également doser dans ce cas la choline en présence de PC.

La choline libre est oxydée en milieu alcalin par une solution de manganate dans un appareil de Parnas et Wagner, suivant la technique de Cotte et Kahane [22]. La triméthylamine formée est entraînée à la vapeur et dosée par acidimétrie en présence d'un indicateur de pH virant vers pH 5,5 (1 g de rouge de méthyle + 0,5 g de vert de bromocrésol + 1 000 ml d'éthanol).

5° Dosage d'ions métalliques.

Nous avons été amené, au cours de ce travail, à doser divers ions métalliques en solutions pures. Nous décrivons rapidement les techniques utilisées.

Nous avons adopté chaque fois qu'il était possible la méthode de dosage par complexométrie avec le sel disodique de l'EDTA en solution 0,1 M (37,21 g/l).

Le magnésium et le zinc sont dosés par l'EDTA en présence de noir d'ériochrome T vers 40° C. Le milieu est tamponné à pH 10 par un tampon $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$. En fin de titrage la solution vire du rouge vin au bleu. 1 ml EDTA 0,1 M = 2,432 mg de magnésium ou 6,538 mg de zinc.

Le calcium est dosé en présence de murexide à pH 12,5. La murexide vire du rouge au bleu violet en présence d'un excès d'EDTA. 1 ml EDTA 0,1 M = 4,008 mg de calcium.

Le lanthane III et le cérium III sont dosés par alcalimétrie de l'acide libéré par l'addition d'EDTA, en présence d'un indicateur de pH dont la zone de virage est voisine du pH de la solution d'EDTA (pH = 5,5). L'indicateur mixte vert de bromocrésol-rouge de méthyle convient particulièrement. On opère à l'aide de deux burettes contenant l'une la solution d'EDTA, l'autre une solution titrée de soude. On ajoute à la solution à doser l'EDTA et l'on neutralise exactement au fur et à mesure l'acidité libérée en ajoutant de la soude. Le dosage est arrêté lorsqu'une nouvelle addition d'EDTA ne provoque plus de libération d'ions H^+ . 1 ml desoude 0,1 M = 7,007 mg de cérium ou 6,996 mg de lanthane.

Le fer III est dosé à 40-50° en milieu acide (pH 2 à 3) par l'EDTA, en présence d'acide sulfosalicylique. La fin du dosage est marquée par la disparition de la coloration rouge du complexe du fer III et de l'acide sulfosalicylique. 1 ml d'EDTA 0,1 M = 5,585 mg de fer.

Le cérium IV est dosé par le sel de Mohr en présence d'orthophénantroline ferreuse suivant la réaction :



On met dans la burette la solution de cérium IV et dans le vase à titrage une quantité connue de sel de Mohr et de deux gouttes de réactif. La solution vire du rose pâle au bleu pâle en fin de titrage. 1 ml de sel de Mohr 0,1 M = 14,01 mg de cérium. Nous avons également utilisé la méthode gravimétrique de CeO_2 après précipitation de l'oxalate cérique et incinération.

Le béryllium est dosé par gravimétrie de BeO , après précipitation de l'hydroxyde par NH_4OH en présence de NH_4Cl et incinération.

DEUXIÈME PARTIE

DISSOCIATION DE LA PHOSPHORYLCHOLINE

CHAPITRE PREMIER

COURBE DE TITRAGE DE LA PHOSPHORYLCHOLINE

On sait que les esters phosphoriques ont la propriété d'être des acides plus forts que l'acide orthophosphorique dont ils sont dérivés.

Les facteurs responsables de cette augmentation sont discutés par Kumler et Eiler [39]. Ces auteurs ont montré en particulier que les facteurs les plus importants sont les effets de solvatation des hydrogènes acides des esters par l'eau, et à un degré moindre, les effets inductif, statistique et stérique. Ces effets sont classiques et ont été discutés en détail par Branch et Calvin [12].

I. — PARTIE EXPÉRIMENTALE.

A) *Solutions de phosphorylcholine*

Nous avons déjà signalé que le pH de ces solutions est voisin de 3,6 et nous avons pensé que la valeur plutôt élevée de ce pH est due au fait que la première acidité phosphorique est ionisée en solution. Pour titrer potentiométriquement cette fonction de la PC, on peut, soit ajouter une quantité connue d'acide puis effectuer normalement le titrage à l'aide d'une solution de base forte, soit ajouter progressivement une solution titrée d'acide à la solution de pH 3,6. C'est cette dernière méthode que nous avons utilisée.

Les solutions titrantes ont été choisies suffisamment concentrées de manière à ne pas modifier sensiblement la concentration des solutions en cours de titrage. Pour des concentrations en PC voisines de 0,1 M, les solutions titrantes étaient 1 N. Le titrage de la première acidité est réalisé à l'aide d'une solution d'acide sulfurique tandis que la deuxième acidité est titrée par une solution de soude décarbonatée, préparée à partir d'une solution saturée de soude.

B) Appareillage

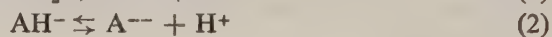
Les titrages ont été effectués à la température du laboratoire à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre « Quéré » type 60. L'utilisation d'une telle électrode est justifiée par le fait que les titrages ne sont pas conduits au-delà de pH 10.

L'étalonnage potentiométrique de l'appareil s'effectue à l'aide de deux solutions tampon étalons du commerce, de pH respectifs $7,00 \pm 0,02$ à 20°C et $3,00 \pm 0,02$ à 20°C . Les lectures de pH sont reproductibles à 0,02 pH entre pH 2 et pH 10, et l'on peut admettre une erreur totale inférieure à 0,05 pH sur les déterminations de pH au cours des titrages.

II. — PARTIE THÉORIQUE.

Nous rappellerons brièvement la théorie des titrages potentiométriques des acides et des bases.

Étant donné un diacide AH_2 , il peut se dissocier deux fois en donnant successivement les anions AH^- et A^{--} . Ces deux dissociations sont figurées par les équilibres :



La loi d'action de masse appliquée à ces deux équilibres donne respectivement les relations (3) et (4) :

$$K_1 = \frac{(\text{AH}^-) (\text{H}^+)}{(\text{AH}_2)} \quad (3)$$

$$K_2 = \frac{(\text{A}^{--}) (\text{H}^+)}{(\text{AH}^-)} \quad (4)$$

dans lesquelles les quantités entre parenthèses représentent les activités des ions correspondants. Les constantes d'équilibre K_1 et K_2 représentent les constantes thermodynamiques de dissociation.

Les relations (3) et (4) s'écrivent sous forme logarithmique :

$$\text{pH} = \text{p}K_1 + \log \frac{(\text{AH}^-)}{(\text{AH}_2)} \quad (5)$$

$$\text{pH} = \text{p}K_2 + \log \frac{(\text{A}^{--})}{(\text{AH}^-)} \quad (6)$$

en posant $\text{pH} = -\log (\text{H}^+)$, $\text{p}K_1 = -\log K_1$ et $\text{p}K_2 = -\log K_2$.

En solution infiniment diluée, les activités peuvent être confondues avec les concentrations, les relations (5) et (6) s'écrivent alors en fonction des concentrations :

$$\text{pH} = \text{pK}_1 + \log \frac{|\text{AH}^-|}{|\text{AH}_2|} \quad (7)$$

$$\text{pH} = \text{pK}_2 + \log \frac{|\text{A}^{--}|}{|\text{AH}^-|} \quad (8)$$

En solution non infiniment diluée, activités et concentrations ne peuvent pas être confondues. $|\text{AH}_2|$, $|\text{AH}^-|$ et $|\text{A}^{--}|$ sont différents de (AH_2) , (AH^-) et (A^{--}) . Les relations (7) et (8) prennent alors la forme :

$$\text{pH} = \text{pK}'_1 + \log \frac{|\text{AH}^-|}{|\text{AH}_2|} \quad (9)$$

$$\text{pH} = \text{pK}'_2 + \log \frac{|\text{A}^{--}|}{|\text{AH}^-|} \quad (10)$$

Si nous groupons les termes relatifs aux coefficients d'activité dans un coefficient unique :

$$\frac{(\text{AH}^-)}{(\text{AH}_2)} = f_1 \times \frac{|\text{AH}^-|}{|\text{AH}_2|} \quad (11)$$

$$\frac{(\text{A}^{--})}{(\text{AH}^-)} = f_2 \times \frac{|\text{A}^{--}|}{|\text{AH}^-|} \quad (12)$$

ce qui donne :

$$\text{pK}'_1 = \text{pK}_1 + \log f_1 \quad (13)$$

$$\text{pK}'_2 = \text{pK}_2 + \log f_2 \quad (14)$$

La dissociation de l'acide AH_2 peut être provoquée par additions successives d'une solution de base forte $\text{BOH} \rightarrow \text{B}^+ + \text{OH}^-$ ce qui permet d'obtenir différentes valeurs des rapports $|\text{AH}^-|/|\text{AH}_2|$ et $|\text{A}^{--}|/|\text{AH}^-|$.

Connaissant d'autre part les valeurs correspondantes du pH, on peut déterminer les valeurs de pK'_1 et pK'_2 à partir des relations (9) et (10).

Soient $|b|$ la quantité de base ajoutée par litre de solution titrée et $|c|$ la concentration totale de l'acide, il existe en solution les relations suivantes :

a) la concentration totale de l'acide est égale à la somme des concentrations de l'acide libre et de l'acide dissocié, ce que traduit l'égalité :

$$|c| = |AH_2| + |AH^-| \quad (15)$$

b) la neutralité électrique de la solution exige que la somme des concentrations des charges positives soit égale à la somme des concentrations des charges négatives, soit :

$$|AH^-| + |OH^-| = |b| + |H^+| \quad (16)$$

Pour le titrage de la première acidité, on peut négliger $|OH^-|$, ce qui donne en tenant compte de (9) la relation de Van Slyke :

$$pK'_1 = pH + \log \frac{|c| - [|b| + |H^+|]}{[|b| + |H^+|]} \quad (17)$$

Pour la deuxième dissociation, on aboutit par un calcul identique à la relation de Henderson-Hasselbach :

$$pK'_2 = pH - \log \frac{|b|}{|c| - |b|} \quad (18)$$

Dans le cas particulier d'un diacide dipolaire que l'on titre à partir de son point isoélectrique, comme c'est le cas pour la PC, la relation (17) doit être transformée en fonction de la concentration $|a|$ de l'acide ajouté pour titrer la première acidité. Il existe entre les concentrations $|a|$ de l'acide ajouté, $|b|$ de la base qu'on doit théoriquement ajouter pour obtenir le même degré de dissociation et $|c|$ du diacide dans la solution, la relation simple suivante :

$$|a| + |b| = |c| \quad (19)$$

En portant dans la relation (17), on obtient :

$$pK'_1 = pH - \log \frac{|c| - [|a| - |H^+|]}{[|a| - |H^+|]} \quad (20)$$

III. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Les résultats des titrages électrométriques des deux acidités de la PC sont consignés dans les tableaux I et II.

Tableau I

Titration de la première acidité de la PC par H_2SO_4 1,00 N
PC = 0,0339 M. Volume initial : 27 ml — T = 22° C

$$\text{pK}'_1 = \text{pH} - \log \frac{|c| - [|a| - |H^+|]}{[|a| - |H^+|]}$$

ml H_2SO_4	pH	$ H^+ \times 10^3$	$ a \cdot 10^3$	$ c \cdot 10^3$	pK'_1
0,20	2,52	3,02	7,4	3,11	1,73*
0,30	2,20	6,31	11,0	3,10	1,45
0,40	2,06	8,70	14,7	3,09	1,44
0,50	1,98	10,47	18,3	3,08	1,51
0,60	1,89	12,87	21,9	3,07	1,51
0,70	1,79	16,20	25,4	3,06	1,42
				Moyenne	$1,47 \pm 0,05$

Tableau II

Titration de la deuxième acidité de la PC par NaOH 1,00 N
PC = 0,0339 M — Volume initial : 25 ml — T = 22° C

$$\text{pK}'_2 = \text{pH} - \log \frac{|b|}{|c| - |b|}$$

ml NaOH	$ b $	$ c $	$\log b/c-b$	pH	pK'_2
0,10	0,0039	0,0338	— 0,872	4,98	5,85
0,20	0,0079	0,0337	— 0,514	5,31	5,82
0,30	0,0119	0,0335	— 0,260	5,58	5,84
0,40	0,0158	0,0334	— 0,047	5,80	5,84
0,50	0,0196	0,0333	0,155	6,00	5,85
0,60	0,0234	0,0331	0,383	6,25	5,87
0,70	0,0272	0,0330	0,672	6,59	5,92*
				Moyenne	$5,85 \pm 0,05$

* Valeurs exclues de la moyenne.

On peut admettre comme valeurs des constantes de dissociation apparentes :

$$\begin{aligned} \text{pK}'_1 &= 1,47 \pm 0,05 & (\text{K}'_1 &= 3,39 \cdot 10^{-2} \pm 0,38 \cdot 10^{-2}) & \text{et} \\ \text{pK}'_2 &= 5,85 \pm 0,05 & (\text{K}'_2 &= 1,41 \cdot 10^{-6} \pm 0,16 \cdot 10^{-6}). \end{aligned}$$

Nous avons confirmé ces valeurs par de nombreux autres titrages sur différentes solutions de PC, y compris une solution de PC cristallisée. Dans tous les cas nous avons obtenu des valeurs de pK'_1 et pK'_2 comprises dans les limites d'erreur que nous avons admises. Si l'on compare ces valeurs à celles de H_3PO_4 ($\text{pK}'_1 = 1,99$ et $\text{pK}'_2 = 6,81$) [35], on observe bien une nette augmentation des deux acidités de la PC par rapport à celles de H_3PO_4 .

On sait que le pH de neutralisation de la première acidité doit être tel que $\text{pH} = 1/2 \text{pK}_1 + 1/2 \text{pK}_2$. En appliquant cette relation au cas de la PC, on obtient $\text{pH} = 3,65 \pm 0,05$. Cette valeur est sensiblement égale à celle des solutions de PC préparées par échange d'ions du sel de magnésium et des solutions d'acide choline-phosphorique cristallisé.

Ceci confirme notre hypothèse selon laquelle la première acidité de la PC est dissociée en solution aqueuse et présente de ce fait une extrémité PO_3H^- . La proximité de la fonction ammonium quaternaire dans la molécule exerce sur cette charge négative une attraction électrostatique et confère à la PC, en solution aqueuse, un caractère d'ion dipolaire. Les interactions entre les extrémités de la molécule de PC sont d'autant plus faibles que l'on se trouve dans un milieu de constante diélectrique plus élevée et l'on obtient alors une structure linéaire. Par contre, dans un milieu de faible constante diélectrique (benzène, dioxanne), on doit avoir une structure semi-cyclique.

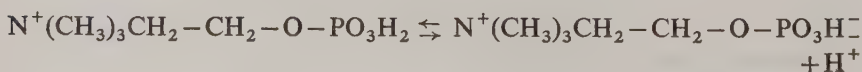
La PC peut exister sous quatre formes ioniques distinctes suivant le pH. L'examen de sa courbe de titrage (figure 2) permet de définir les domaines d'existence de ces différentes formes ioniques.

1° Milieu fortement acide.

En milieu fortement acide la PC peut exister sous forme d'acide conjugué dans laquelle un proton vient se fixer sur un site donné de la molécule. Les sites possibles sont l'oxygène semi-polaire de la liaison $\text{P} = \text{O} \rightarrow \text{P}^+ - \text{O}^-$ ou l'oxygène de la fonction alcoolique de la choline.

2° pH en dessous de 3,6.

Jusqu'à pH 3,6 la forme non ionisée $^+\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$ est en équilibre avec la forme dipolaire qui atteint sa concentration maximum à ce pH.



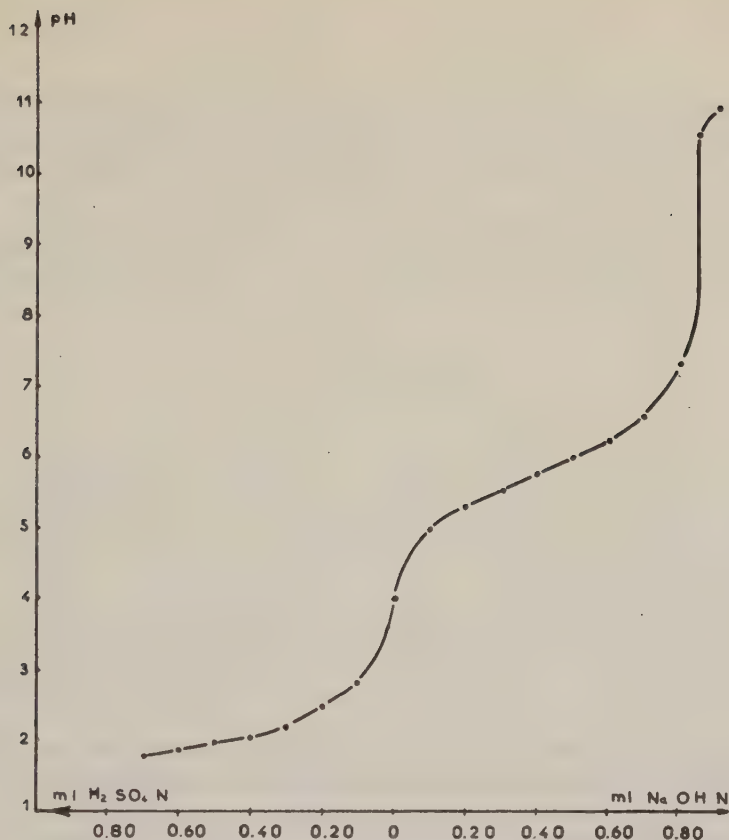
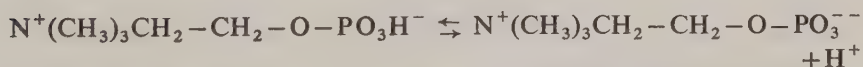


Fig. 2. — Courbe de titrage d'une solution 0,0339 M de phosphorylcholine (acide libre); volume = 25 ml, T = 22° C.

3° pH compris entre 3,6 et 8,0.

Entre pH 3,6 et 8,0 environ, la forme dipolaire et la forme di-ionisée sont en équilibre de dissociation :



4° Milieu alcalin.

Au-dessus de pH 8,0 c'est la forme di-ionisée qui se trouve pratiquement seule en solution. L'addition d'un troisième équivalent de soude est sans effet sur l'ionisation de la fonction $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$.

IV. — DISCUSSION.

Nos résultats montrent que les deux acidités de la PC sont plus fortes que les acidités correspondantes de l'acide orthophosphorique. La diminution de pK' de la première acidité (0,49 pK) est du même ordre que celle que l'on observe avec la majorité des monoesters orthophosphoriques

d'alcools aliphatiques. Par contre, la diminution du pK'_2 (1,04 pK) est particulièrement élevée. Dans la série des esters phosphoriques éthyl-substitués seul l'acide aminoéthylphosphorique (AEP) présente la même propriété. (Tableau III.)

Le rapprochement qui s'impose entre cet ester et la PC, est la présence des groupements $+NH_3$ dans l'AEP et $+N(CH_3)_3$ dans la PC.

Tableau III

Esters	pK'_1	pK'_2	Références
Ethyl - P	1,43	6,65	[24]
Hydroxy-Ethyl - P	1,27	6,17	[24]
Amino-éthyl - P	1,81	5,77	
Diose - P	1,38	6,20	[24]
Choline - P	1,47	5,85	

On peut expliquer l'augmentation d'acidité observée par un effet inductif de ces groupements fortement positifs. On sait que les groupements ammonium quaternaires sont fortement attracteurs d'électrons. Cet effet se transmettant le long de la chaîne carbonée crée sur l'atome de phosphore une charge positive partielle qui favorise la séparation des protons, donc l'augmentation de l'acidité. L'effet doit être d'autant plus marqué que le radical $+N(CH_3)_3$ est plus rapproché du groupement phosphorique. Ceci semble être confirmé dans le cas de l'amino-phosphate [39] ($pK_1 < 0$, $pK_2 = 2,8$ et $pK_3 = 8,2$) où l'augmentation d'acidité est encore plus marquée du fait de la proximité des charges positives et négatives $+NH_3 - PO_3H^-$. Par contre, lorsqu'on augmente la distance entre les charges, on devrait assister à une diminution de l'acidité. Il serait intéressant pour cela d'étudier les variations des pK dans la série des acides triméthylaminoalkylphosphoriques. Akerfeldt [1] signale que l'acide aminoéthylthiophosphorique ($pK'_2 = 4,65$) est plus fort que l'acide aminopropylthiophosphorique ($pK'_2 = 5,12$), ce qui semble confirmer notre hypothèse.

V. — INFLUENCE DE LA CONSTANTE DIÉLECTRIQUE DU MILIEU.

On sait que le pK des acides dipolaires est beaucoup moins influencé par les variations de constante diélectrique du milieu que les acides dont la dissociation se traduit simplement par la formation d'un proton et

d'un anion. L'acide acétique ($pK_A = 4,756$), présente dans un mélange dioxanne-eau à 70 %, un pK_A égal à 8,321, tandis que pour le glycolle, le pK_1 passe dans les mêmes conditions de 2,350 à 3,965 [25].

Nous avons déterminé les différentes valeurs de pK'_2 dans divers mélanges dioxanne-eau faisant ainsi varier la constante diélectrique du milieu (Tableau IV).

Tableau IV

% dioxanne dans le mélange	0	10	25	37,3	50
Constante diélectrique	78	71	60	50	40
pK'_2	5,84	6,10	6,50	7,02	7,35

L'augmentation de pK'_2 observée (1,51 pK), en milieu dioxanne-eau 50 %, est de l'ordre de celle observée dans le cas du glycolle, ce qui semble confirmer le caractère dipolaire de la PC.

VI. — COURBE DE TITRAGE DE LA SOLUTION HYDROLYSÉE.

Il est intéressant de voir comment évolue la courbe de titrage de la PC lorsqu'on la soumet à une hydrolyse prolongée.

Prenons une solution de PC telle qu'elle est obtenue par échange d'ions du sel de magnésium sur résine cationique. Le pH initial de cette solution est de 3,6; sa courbe de titrage est connue. Soumettons-là à une ébullition à reflux pendant 24 heures et déterminons la courbe de titrage de la solution ainsi hydrolysée.

On observe les modifications suivantes :

a) Le pH de la solution est passé de 3,6 à 4,2.

b) Le pK'_2 est passé de 5,85 à 6,89 et correspond sensiblement au pK'_2 déterminé pour le titrage d'un mélange équimoléculaire d'acide phosphorique et de choline ($pK'_2 = 6,88$).

Le dosage du phosphore inorganique et de la choline montre qu'il s'est formé une molécule de phosphate pour une molécule de choline; de plus, les quantités libérées correspondent, aux erreurs expérimentales près, à une hydrolyse pratiquement totale.

Cette expérience indique que les produits finaux de l'hydrolyse sont l'orthophosphate et la choline. Elle montre qu'à un pH donné une solution non tamponnée de PC évolue par hydrolyse vers un mélange PC-orthophosphate-choline ou orthophosphate-choline (selon que cette hydrolyse

est partielle ou totale) de pH plus alcalin. Pour une série d'esters phosphoriques donnés la variation du pH par hydrolyse sera d'autant plus marquée que les écarts des pK'_2 de ces esters et de H_3PO_4 sont plus grands.

VII. — RÉSUMÉ.

Les constantes de dissociation apparentes de la PC sont plus grandes que celles de l'acide orthophosphorique ; cette propriété résulte principalement de l'effet inductif du groupe ammonium quaternaire de la choline.

Le pH relativement élevé des solutions de PC est dû au fait que l'une des fonctions phosphoriques est ionisée en solution, ce qui confère à la molécule de PC un caractère dipolaire.

L'influence de la constante diélectrique du milieu sur la dissociation de la PC est faible, ce qui semble confirmer la nature dipolaire de la molécule.

Après hydrolyse totale, la courbe de titrage de la PC est identique à la courbe de titrage d'un mélange équimoléculaire d'acide phosphorique et de choline.

CHAPITRE II

COURBES DE TITRAGE EN PRÉSENCE D'IONS MÉTALLIQUES

Les propriétés complexantes des orthophosphates vis-à-vis de nombreux ions métalliques sont connues depuis longtemps [64]. Parmi les ions métalliques les plus étudiés, les ions Mg^{++} [31], Ca^{++} [31], Sr^{++} [61], Mn^{++} [61] et Fe^{+++} [40], donnent avec l'ion $HOPO_3^-$ des complexes solubles de formule $(MHPO_4)^{(v-2)+}$, v étant la valence de l'ion métallique. Par contre, il ne semble pas que l'ion $(HO)_2PO_2^-$ possède une telle propriété.

Si l'on considère un monoester orthophosphorique $ROPO_3H_2$, celui-ci peut exister sous forme dinégative $ROPO_3^{--}$, et l'on peut supposer *a priori* que les propriétés complexantes du groupement $-PO_3^{--}$ vis-à-vis des ions métalliques sont susceptibles de se manifester également dans les monoesters.

I. — CONSTANTES DE STABILITÉ DES COMPLEXES.

Un des procédés les plus courants pour mettre en évidence la formation de complexes consiste à étudier les modifications de pH provoquées par la présence d'un ion métallique supposé complexant sur une solution du ligand [16].

Étant donné un acide AH dont l'anion A^- est susceptible d'être complexé par un ion métallique M, il existe en solution les relations suivantes :

En l'absence d'ion métallique, nous avons :

$$pH = pK' + \log \frac{|A^-|}{|AH|} \quad (1)$$

Si nous désignons par T_A la concentration totale de l'acide et par $|b|$ la concentration de la base ajoutée en un point de la courbe de titrage :

$$T_A = |A^-| + |AH| = b + |AH| \quad (2)$$

d'où :

$$pH = pK' + \log \frac{|b|}{T_A - |b|} \quad (3)$$

Désignons, en faisant abstraction des charges, par AM_n la formule du complexe formé en présence d'ion métallique. Sa formation se traduit par la relation d'équilibre :



La constante de formation vraie C_0 de ce complexe est égale à :

$$C_0 = \frac{(AM_n)}{(A^-) (M)^n} \quad (4)$$

dans cette expression les quantités entre parenthèses représentent les activités des espèces ioniques correspondantes. La constante C_0 est reliée à la constante apparente C déterminée à une température et une force ionique données par la relation :

$$C = C_0 \frac{\gamma_{AM_n}}{\gamma_{A^-} \cdot (\gamma_M)^n} \quad (5)$$

C étant égal à :

$$C = \frac{|AM_n|}{|A^-| |M|^n} \quad (6)$$

En un point donné de la courbe de titrage, en présence d'ion métallique, on a :

$$b = T_A - |AH| = |A^-| + |AM_n| \quad (7)$$

Soit, d'après la relation (6) :

$$|A^-| = \frac{|b|}{1 + C|M|^n} \quad (8)$$

Désignons par K'^* la constante de dissociation apparente de l'acide en présence de l'ion métallique :

$$K'^* = \frac{|A^-| |H^+|}{|AH|} \quad (9)$$

L'introduction de l'ion métallique entraîne des modifications sensibles des propriétés physico-chimiques de la solution, en particulier de la constante diélectrique du milieu [57] et de la force ionique. Du fait de la variation

de la constante diélectrique, la constante de dissociation de l'acide est modifiée; d'autre part, la variation de la force ionique modifie les coefficients d'activité des ions, donc K' . Il en résulte que K'^* est différent de K' .

La relation (9) s'écrit :

$$pH = pK'^* + \log \frac{|A^-|}{|AH|} \quad (10)$$

En tenant compte de la relation (8) :

$$pH = pK'^* + \log \frac{|b|}{T_A - |b|} - \log [1 + C|M|^n] \quad (11)$$

Si l'on compare les expressions (3) et (11) on constate que les courbes de titrage en absence et en présence d'ions métalliques présentent un décalage $\Delta pK'$ tel que :

$$\begin{aligned} \Delta pK' &= pK' - pK'^* + \log [1 + C|M|^n] \\ &= \Delta pK'^* + \log [1 + C|M|^n] \end{aligned} \quad (12)$$

Ce décalage est constant si $|M|$ est constant, c'est-à-dire si la concentration totale T_M de l'ion métallique est grande par rapport à la concentration totale en acide. Dans ce cas, $|M|$ est peu différent de T_M et si, par ailleurs, C est suffisamment grand, on peut négliger 1 devant $C|M|^n$. La fonction $y = \Delta pK' - \Delta pK'^*$ doit tendre vers $\log [C(T_M)^n]$ soit :

$$y \simeq \log C + n \log T_M \quad (13)$$

La courbe des variations de y en fonction de $\log T_M$ doit être une droite de pente n et d'ordonnée à l'origine (concentration molaire en ion métallique) égale à $\log C$.

En solution non diluée, la valeur $\Delta pK''$ du décalage de la courbe de titrage déterminée expérimentalement en présence de l'ion métallique doit être différente de la valeur y qui résulterait de la seule formation du complexe AM_n .

L'abaissement global observé dans ces conditions est dû en majeure partie à la formation du complexe, mais également aux effets de la force ionique (abaissement de pH) et aux modifications de la constante diélectrique de l'eau (augmentation de pH). Si l'on admet que ces effets se compensent partiellement, la courbe $\Delta pK'' = f(\log T_M)$ sera une droite dont le coefficient angulaire est voisin du nombre de coordinance n . L'ordonnée à

l'origine ne représente pas cependant le logarithme de la constante de formation apparente C du complexe. La valeur expérimentale $\log C'$ de cette ordonnée peut fournir, toutes choses égales par ailleurs, un élément de comparaison des constantes de stabilité des complexes formés avec différents ions métalliques.

Nous nous sommes proposé d'étudier dans ce chapitre, d'une part les courbes de titrage de quelques sels de PC, d'autre part l'effet de quelques ions métalliques sur la courbe de titrage de la PC.

II. — COURBES DE TITRAGE DES SELS DE PC.

Les sels de PC étudiés sont le choline-phosphate de magnésium $(PC)_2Mg$, $14 H_2O$ (P. M. = 640), le chlorure de choline-phosphate de calcium $ClPCCa$, $4 H_2O$ (P.M. = 329,5), produits cristallisés industriels, et le choline-phosphate de sodium que nous avons préparé par échange d'ions du choline-phosphate de magnésium.

Les solutions de ces sels sont alcalines. Les titrages ont été conduits à l'aide d'une solution d'acide fort normal. Le dispositif électrométrique est le même que celui décrit pour le titrage de l'acide.

Les résultats de ces déterminations sont consignés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau I

Titrage d'une solution de $(PC)_2Mg$ 0,100 M par H_2SO_4 1,00 N
Volume = 20 ml · T = 22° C

$$pK_2'' = pH - \log \frac{|C| - |A|}{|A|}$$

ml H_2SO_4 N	pH	A	C	pK_2''
0	8,60	—	—	—
1,00	6,03	0,0426	0,190	5,49
1,50	5,78	0,0698	0,186	5,56
2,00	5,52	0,0910	0,182	5,52
2,50	5,30	0,1110	0,178	5,52
3,00	5,00	0,1305	0,174	5,48
4,00	3,12	—	—	—
			Moyenne	$5,52 \pm 0,04$

Tableau II

Titration d'une solution de ClPCCa 0,103 M par H_2SO_4 1,00 N

Volume = 20 ml · T = 22° C

$$\text{pK}_2'' = \text{pH} - \log \frac{[\text{C}] - [\text{A}]}{[\text{A}]}$$

ml H_2SO_4	pH	[A]	[C]	pK_2''
0	7,9	—	—	—
0,50	6,01	0,0244	0,1005.	5,52
0,75	5,80	0,0362	0,0995	5,56
1,00	5,60	0,0476	0,0982	5,57
1,25	5,40	0,0588	0,0970	5,59
1,50	5,18	0,0697	0,0954	5,61
1,75	4,90	0,0805	0,0949	5,65
2,00	4,10	—	—	—
			Moyenne	5,58 ± 0,05

Tableau III

Titration d'une solution de choline-phosphate de sodium

0,14 M par H_2SO_4 0,99 N

Volume = 20 ml. — T = 23° C

$$\text{pK}_2'' = \text{pH} - \log \frac{[\text{C}] - [\text{A}]}{[\text{A}]}$$

ml H_2SO_4	pH	[A]	[C]	pK_2''
0,40	6,58	0,0194	0,1372	5,80
0,80	6,18	0,0380	0,1345	5,78
1,20	5,90	0,0561	0,1320	5,77
1,60	5,61	0,0734	0,1297	5,77
2,00	5,30	0,0900	0,1271	5,70
			Moyenne	5,75 ± 0,05

L'examen des résultats obtenus montre que la présence des ions Mg^{++} , Ca^{++} et Na^+ provoque un abaissement de pK_2' . Les faits observés sont en faveur de l'hypothèse de l'existence en solution de complexes de ces ions avec la forme di-ionisée de la PC.

L'abaissement de pK_2' observé avec les ions Na^+ , quoique faible, ne peut pas être attribué à un simple effet de force ionique. En effet, les courbes de titrage de PC en présence d'ions cholinium ou tétraméthyl-

ammonium, qui ne présentent aucun pouvoir complexant vis-à-vis des phosphates, ne sont pas modifiées.

Il semble donc, que les abaissements observés sont bien dûs à la formation de complexes entre la PC et les ions Mg^{++} , Ca^{++} et Na^+ .

Du fait que l'on opère sur des sels de PC, c'est-à-dire à des concentrations en ions métalliques relativement faibles, ces expériences ne présentent qu'un caractère indicatif et ne permettent pas de déterminer les constantes de formation des complexes.

L'étude des courbes de titrages de la PC en présence de concentrations plus fortes en ions métalliques doit permettre de rendre le phénomène plus net.

A) Etude des courbes de titrage de la PC en présence des ions Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} , Ba^{++} et Na^+

1° Mise en évidence de complexes.

Nous déterminons les courbes de titrage de la PC à la concentration 0,05 M en présence de divers ions en concentration 0,5 M.

La courbe de titrage en présence d'ions Mg^{++} est déterminée à partir du sel de magnésium $(PC)_2Mg$, 14 H_2O . Dans les autres cas, nous utilisons les solutions d'acide préparées par échange d'ions du sel de magnésium. Les courbes de titrage correspondantes sont représentées dans les figures 3 et 4.

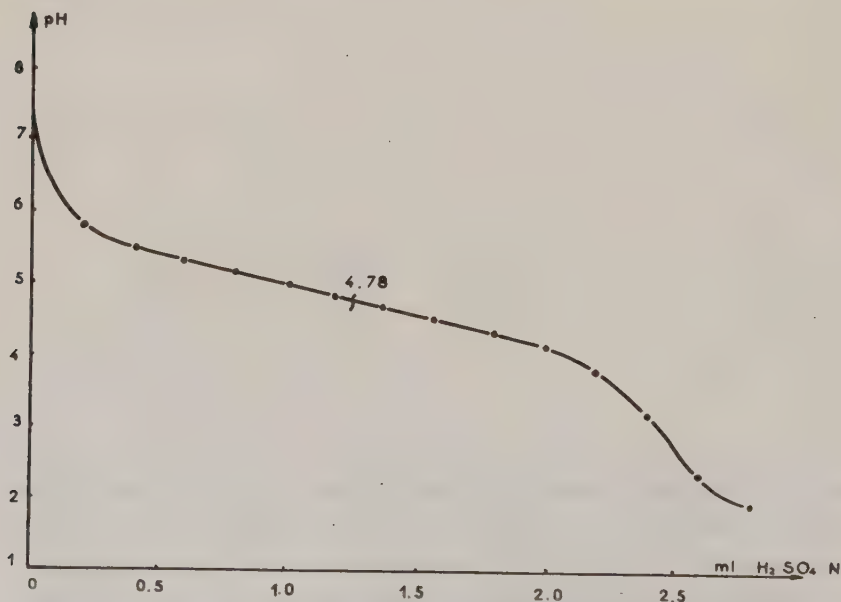


Fig. 3. — Courbe de titrage de la phosphorylcholine (sel de magnésium) en présence d'ions Mg^{++} . (PC) = 0,05M, (Mg^{++}) = 0,5M. Volume = 50 ml. T = 20°C.

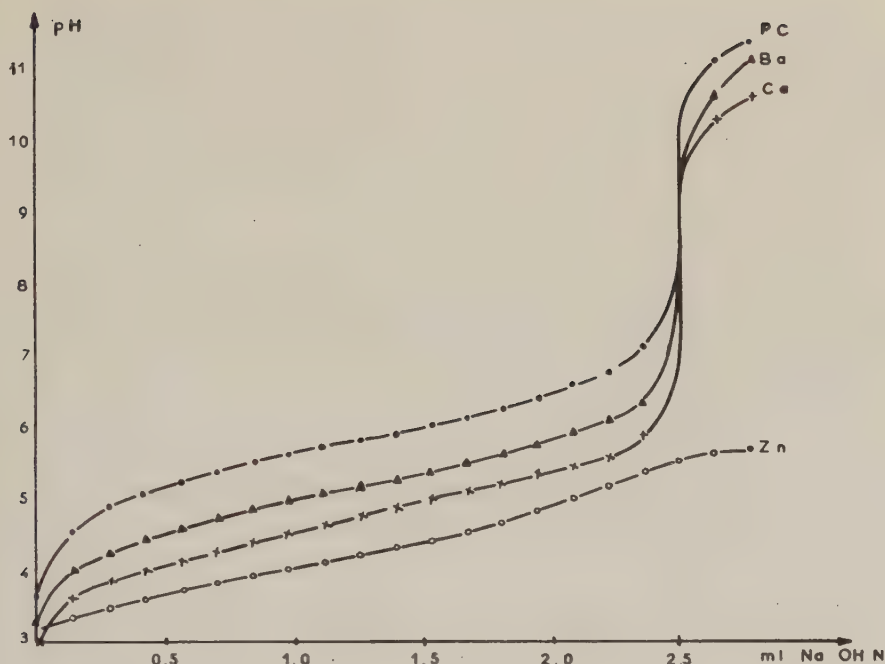


Fig. 4. — Courbe de titrage de la phosphorylcholine en présence d'ions Ba^{++} , Ca^{++} et Zn^{++} (0,5M). (PC) = 0,05M; $T = 20^\circ\text{C}$.

Il est intéressant de remarquer sur les diverses courbes de titrage, que, même en fortes concentrations, les ions Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} , Ba^{++} et Na^+ ne modifient pas l'allure de la courbe : la présence de l'ion métallique se traduit simplement par un abaissement de la courbe de titrage, de plus, le volume de soude versé entre les branches verticales de la courbe de titrage est le même en l'absence ou en présence d'ion métallique.

Les valeurs pK_2'' du pH de demi-neutralisation de la deuxième acidité en présence d'ions métalliques en concentration 0,5 M sont récapitulées dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV

	NaCl	Chlorure Choline	MgCl_2	CaCl_2	ZnCl_2	BaCl_2
pK_2''	5,55	5,79	4,78	4,80	4,17	5,21
$\text{pK}_2' - \text{pK}_2''$	0,30	0,06	1,07	1,05	1,68	0,74
Force ionique	0,5	0,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Ce tableau met en évidence un abaissement du pK'_2 avec la majorité des ions étudiés. Seuls les ions cholinium provoquent un abaissement négligeable du pK'_2 même en forte concentration, ce qui semble indiquer que la force ionique n'a pas une grande influence sur le pK'_2 de la PC. Les abaissements de pK'_2 observés sont dans l'ordre $Zn > Mg > Ca > Ba > Na > \text{choline}$, et figurent probablement l'ordre de stabilité décroissante des complexes formés.

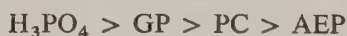
Nous avons étudié d'autre part l'influence de l'ion Mg^{++} en concentration 0,5 M sur le pK'_2 de l'acide orthophosphorique et de deux esters phosphoriques : l'acide 1-glycérophosphorique (GP) et l'acide amino-éthylphosphorique (AEP). Les résultats obtenus sont figurés dans le tableau V.

Tableau V
Influence de l'ion Mg^{++} sur le pK'_2 de l'acide phosphorique
et de quelques esters phosphoriques

	pK'_2	pK''_2	$pK'_2 - pK''_2$
H_3PO_4	6,88	5,25	1,63
GP	6,25	4,98	1,27
AEP	5,77	4,87	0,90
PC	5,85	4,78	1,07

L'étude de l'effet des ions Mg^{++} sur le pK'_2 de l'acide phosphorique et des esters phosphoriques envisagés, indique que l'on a bien une formation de complexe.

En effet dans cette expérience, nous nous sommes placés dans chacun des cas à des concentrations égales en ions Mg^{++} (0,5 M), donc à même force ionique et à la même valeur de la constante diélectrique. Les effets propres aux ions Mg^{++} susceptibles d'influencer le pH du milieu sont donc les mêmes dans les trois cas. Étant donné que les effets observés sont semblables, l'abaissement de pK'_2 observé pour H_3PO_4 , dont on sait qu'il donne des complexes avec les ions Mg^{++} , permet d'affirmer qu'on a en solution des complexes de même type avec les esters phosphoriques étudiés. D'après les valeurs des abaissements de pK'_2 la force de ces complexes est telle que :



Puisque c'est un abaissement de pK'_2 que l'on observe, ces complexes sont formés entre la forme di-ionisée $ROPO_3^{--}$ et l'ion métallique et répondent à la formule chimique $(ROPO_3M_n)^{(2n-2)+}$.

L'étude de l'influence des ions Ca^{++} sur le pK'_2 de l'acide phosphorique n'est pas possible par suite de la précipitation de phosphate de calcium; par contre, elle est possible avec les esters phosphoriques, qui ne donnent pas de précipités. Les abaissments que nous observons avec la PC et l'acide 1-glycérophosphorique en présence de CaCl_2 0,5 M sont respectivement de 1,05 pK et 1,09 pK, ce qui indique que les complexes de calcium de ces deux esters sont à peu près de même force.

Parmi les complexes de monoesters orthophosphoriques et d'ions métalliques signalés dans la littérature, citons les travaux de Smith et Alberty [60] et de Martell et Schwarzenbach [49] qui ont montré l'existence de complexes de l'adénosine-monophosphate et du créatine-phosphate avec les ions Na^+ , K^+ , Li^+ , Ca^{++} et Mg^{++} . Il résulte des travaux de ces auteurs que les complexes des monoesters orthophosphoriques sont plus faibles que ceux de l'acide orthophosphorique, et que l'ordre de stabilité de ces complexes est dans les deux cas le suivant :



Les résultats que nous obtenons dans le cas de la PC montrent que l'ordre est le même pour les ions que nous avons étudiés.

2° Détermination de la formule des complexes.

La relation (13) $y = \log C + n \log T_M$ peut être utilisée pour le calcul du nombre de coordinance n des complexes. On détermine pour cela les valeurs de pK''_2 à différentes concentrations en ions métalliques.

A une solution 0,05 M d'ester porté au pK'_2 par addition de la quantité calculée de soude, nous ajoutons progressivement une solution 2 M du chlorure de l'ion métallique étudié et nous notons la valeur correspondante du pH.

La courbe représentant les variations de $\text{pK}'_2 - \text{pK}''_2$ en fonction de $\log T_M$ est une droite de pente n . La figure 5 représente les variations de cette fonction pour H_3PO_4 et PC en présence d'ions Mg^{++} .

Nous portons en abscisses $\log \text{Mg}^{++}$ et en ordonnées $y = \text{pK}'_2 - \text{pK}''_2$.

Les courbes tendent vers des droites dont la pente est voisine de 1. Cette expérience confirme d'une part l'existence du complexe MgHPO_4 , d'autre part elle montre celle d'un complexe 1 : 1 de formule $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{PO}_3\text{Mg}$ entre la forme di-ionisée de la PC et les ions Mg^{++} .

Les ions Ca^{++} et Zn^{++} nous donnent des résultats semblables à ceux observés en présence d'ions Mg^{++} . Les pentes obtenues sont respectivement $0,9 \pm 0,1$ et $1,1 \pm 0,1$. On peut donc conclure à la formation, en solution, de complexes 1 : 1 de ces ions avec la PC.

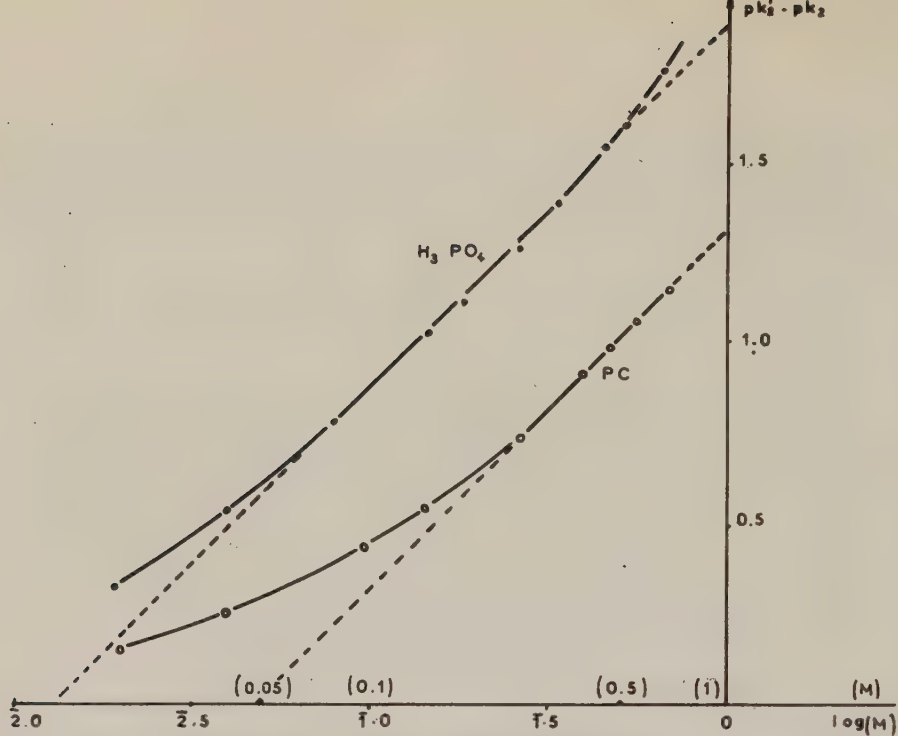


Fig. 5. — Abaissements de pK'_2 provoqués par l'addition d'ions Mg^{++} à des solutions d'acide orthophosphorique et de phosphorylcholine 0,05M.

Abscisses : concentration des ions Mg^{++} ; ordonnées : abaissements de pK'_2 .

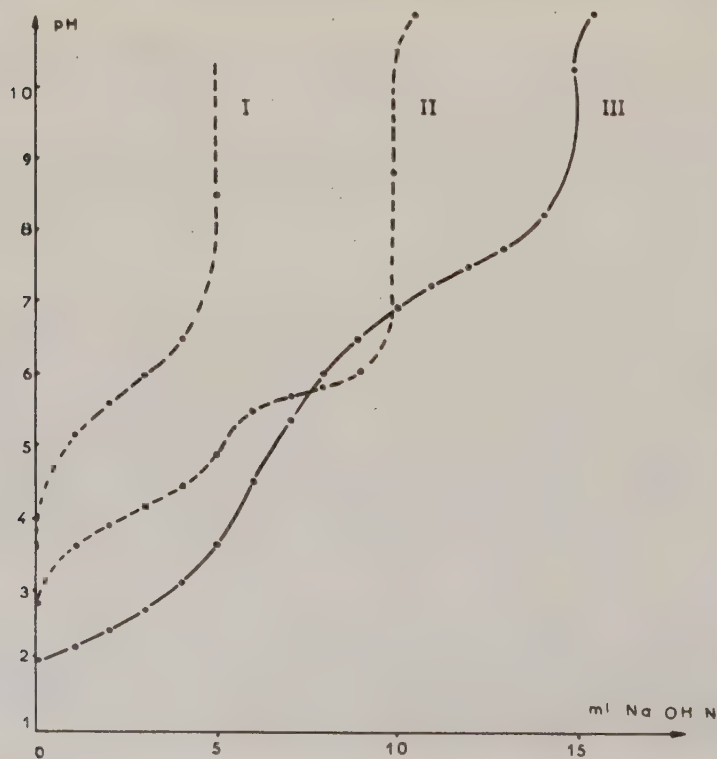


Fig. 6. — Courbe de titrage de la phosphorylcholine en présence d'ions Be^{++} . $T = 20^\circ C$; volume = 100 ml. I : PC = 0,05M; II : Be = 0,05M; III : PC = 0,05M + Be^{++} = 0,05M.

*B) Etude des courbes de titrage de la PC
en présence des ions Be^{++} , Fe^{+++} , Al^{+++} , La^{+++} et Ce^{+++} .*

Les ions étudiés dans cette partie sont ceux dont la présence modifie notablement la courbe de titrage de la PC.

1° Courbe de titrage en présence d'ions Be^{++} .

La figure 6 représente la courbe de titrage de la PC en concentration 0,05 M en présence de $BeCl_2$ 0,05 M. On observe que la présence de l'une de ces substances modifie notablement la courbe de titrage de la seconde.

Bien qu'un abaissement de pK'_2 ne puisse pas être mis en évidence, il est significatif de constater, du moins entre pH 2 et 5,7, que la courbe de titrage du mélange est fortement abaissée par rapport à celle de la PC seule ou à celle du chlorure de beryllium.

D'autre part, on sait que le retard à la précipitation d'un composé insoluble d'un ion métallique est le témoignage de la complexation de cet ion.

En l'absence de PC, on constate que l'hydroxyde de beryllium commence à précipiter vers pH 5,7 après addition de 7 ml de soude normale; par contre, en présence de PC, la précipitation commence vers pH 7,2, après addition de 11 ml de soude.

La libération d'ions H^+ observée ainsi que le retard à la précipitation de l'hydroxyde semblent indiquer la formation d'un complexe entre la PC et les ions Be^{++} .

2° Courbe de titrage en présence d'ions Fe^{+++} .

La figure 7 montre, comme dans le cas des ions Be^{++} une modification de l'allure des courbes de titrage de PC 0,05 M ou de $FeCl_3$ 0,05 M lorsque l'on met les solutions de ces substances en présence l'une de l'autre. Le contour de la courbe obtenue ne permet pas de mettre en évidence l'abaissement du pK'_2 de la PC.

Lors du titrage de $FeCl_3$ 0,05 M on constate que l'hydroxyde ferrique commence à précipiter vers pH 2,20 après addition de 4 ml de soude normale; en présence de PC 0,05 M le début de précipitation a lieu vers pH 2,5 après addition de 8 ml de soude.

En solution plus diluée (0,01 M) les ions Fe^{+++} sont décolorés en présence de PC 0,05 M; les pH de début de précipitation de $Fe(OH)_3$ en l'absence et en présence de PC sont respectivement 2,6 et 6,3.

Ce retard à la précipitation de l'hydroxyde peut s'interpréter par une formation de complexe entre PC et les ions Fe^{+++} .

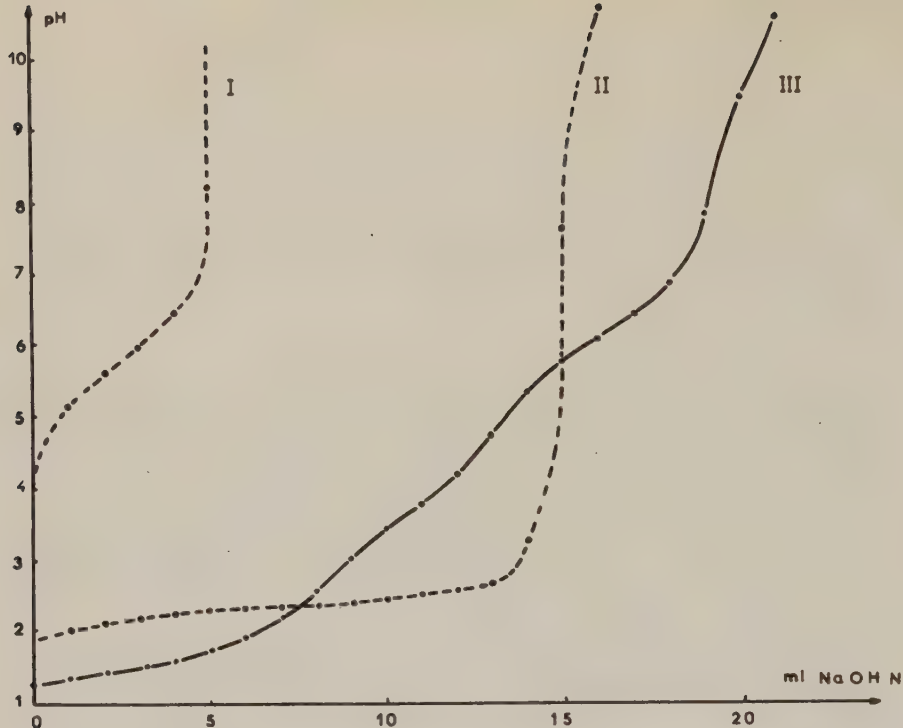


Fig. 7. — Courbe de titrage de la phosphorylcholine en présence d'ions Fe^{+++} . $T = 20^\circ\text{C}$; volume = 100 ml. I : PC = 0,05M; II : $\text{Fe}^{+++} = 0,05\text{M}$; III : PC = 0,05M + $\text{Fe}^{+++} = 0,05\text{M}$.

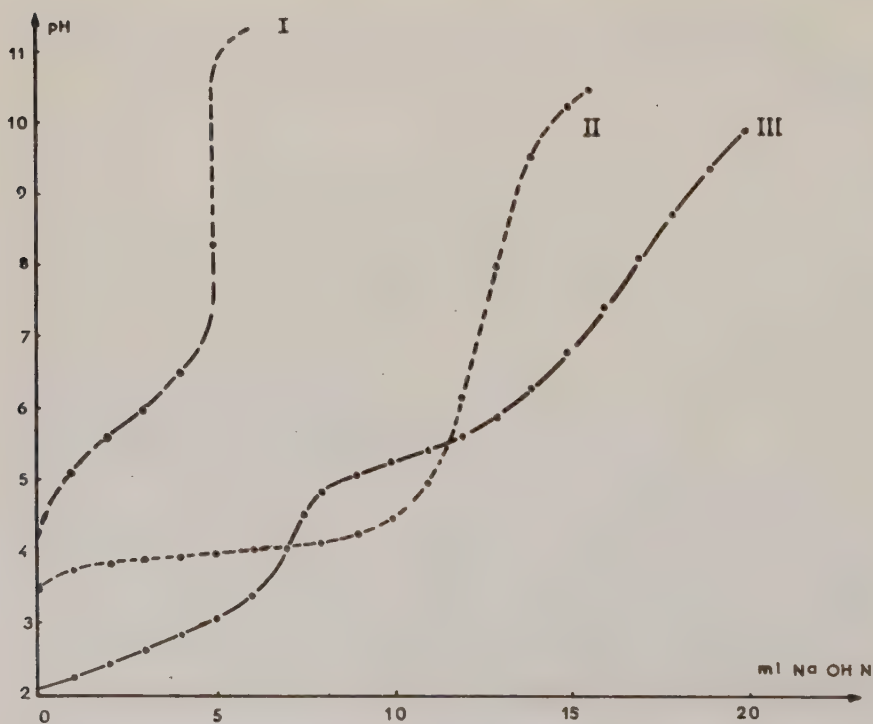


Fig. 8. — Courbe de titrage de la phosphorylcholine en présence d'ions Al^{+++} . $T = 20^\circ\text{C}$; volume = 100 ml. I : PC = 0,05M; II : $\text{Al}^{+++} = 0,05\text{M}$; III : PC = 0,05 M + $\text{Al}^{+++} = 0,05\text{M}$.

3° Courbe de titrage en présence d'ions Al^{+++} .

La figure 8 montre que les ions Al^{+++} exercent un effet identique à celui des ions Fe^{+++} sur le titrage de la PC. En l'absence de PC le début de précipitation de l'hydroxyde se produit vers pH 3,8, après addition de 2 ml de soude normale, tandis qu'en présence de PC on l'observe vers pH 8,6, après addition de 18 ml de soude normale.

Il faut remarquer que l'addition d'une solution de $\text{Al}(\text{SO}_4)_3$ (pH = 3,5) à une solution de PC (pH = 3,6) se traduit par une importante acidification de la solution (pH = 2,1).

Le retard à la précipitation de l'hydroxyde et l'acidification observés sont les indices d'une formation de complexe entre la PC et les ions Al^{+++} .

4° Courbe de titrage en présence d'ions La^{+++} .

A l'encontre des faits observés pour les ions Be^{++} , Fe^{+++} et Al^{+++} , la courbe de titrage de PC en présence d'ions La^{+++} comporte deux branches distinctes. La figure 9 montre que l'on obtient une première inflexion vers pH 6,3, après addition de la quantité stœchiométrique de soude corres-

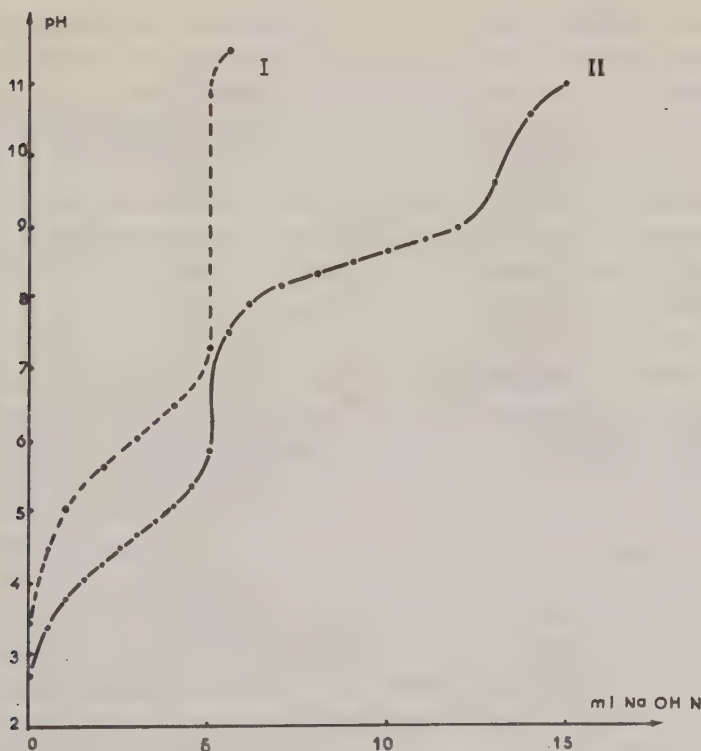


Fig. 9. — Courbe de titrage de la phosphorylcholine en présence d'ions La^{+++} . $T = 20^\circ\text{C}$; volume = 100 ml. I : PC = 0,05M; II : PC = 0,05M + La^{+++} = 0,05M.

pendant à la PC. On observe une seconde inflexion en milieu alcalin pour un volume total de soude égal à celui utilisé pour le titrage du sel de lanthane seul. La présence des ions La^{+++} provoque un abaissement notable du pK'_2 de la PC pour une concentration relativement faible en ion métallique (0,05 M). Le nombre d'équivalents de soude ajoutés pour titrer le sel de lanthane est inférieur à 3, ceci résulte de la formation de sels basiques.

Lors du titrage, la solution de $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ devient opalescente à pH 8,2, après addition de 0,25 ml de soude normale; en présence de PC, l'opalescence apparaît à pH 9,8, après addition de 12,5 ml de soude. Ce retard notable à la précipitation de l'hydroxyde est en faveur d'une formation de complexe entre la forme di-ionisée de la PC et les ions La^{+++} .

L'abaissement important de pK'_2 (1,5 pK) observé se produit pour une concentration pratiquement équimoléculaire de PC et La^{+++} . Dans les mêmes conditions, les ions Mg^{++} et Ca^{++} provoquent des abaissements de pK et l'ordre de 0,3 pK, ce qui laisse supposer que le complexe formé est particulièrement stable.

5° Courbe de titrage en présence d'ions Ce^{+++} .

Les courbes de titrage de PC en présence de Ce^{+++} sont du même type que celles obtenues avec les ions La^{+++} . On observe une première inflexion après addition de la quantité de soude correspondant au titre de la PC dans la solution, puis une seconde inflexion en milieu alcalin pour un volume total de soude égal à celui utilisé pour le titrage du sel de cérium seul.

En milieu alcalin, l'addition de soude s'accompagne d'abord de la formation d'un précipité d'hydroxyde qui se redissout au bout de quelques instants en même temps que la solution prend une coloration brune caractéristique et devient plus acide.

Ce phénomène ne se produit pas en l'absence de PC, où l'on observe directement la précipitation de l'hydroxyde sans redissolution, ou en présence d'un autre ester phosphorique comme l'acide 2-glycéro-phosphorique, l'addition de cet ester se traduisant simplement par la dissolution de l'hydroxyde cérique. Avec la PC, la coloration brune va en s'intensifiant à mesure que l'on ajoute de la soude et la solution demeure parfaitement limpide pour des pH où les ions cériques sont normalement à l'état d'hydroxyde. Lorsque l'on atteint un volume de soude égal à celui utilisé pour le titrage des ions Ce^{+++} seuls, on observe l'apparition d'un précipité blanc d'hydroxyde cérique. Comme avec les ions La^{+++} , on observe un retard notable à la précipitation de l'hydroxyde. Dans le cas d'un mélange équimoléculaire de PC et d'ions Ce^{+++} (0,04 M), la turbidité apparaît vers pH 9,3, après addition de 12 ml de soude normale, alors qu'en l'absence de PC elle apparaît vers pH 7,4, après addition de 0,25 ml de soude.

III. — DISCUSSION.

Les ions métalliques que nous venons d'étudier peuvent se classer en trois groupes différents suivant l'allure de la courbe de titrage qu'ils présentent avec la PC.

1° Les ions métalliques dont la présence ne modifie pas, même à de fortes concentrations, la forme de la courbe de titrage de la PC. Les courbes obtenues en présence de ces ions mettent en évidence l'abaissement du pK'_2 de la PC et la quantité de soude ajoutée entre les deux branches verticales de la courbe de titrage correspond au titre de la PC dans la solution. Ces ions sont Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} , Ba^{++} et Na^+ .

2° Le groupe des ions Be^{++} , Al^{+++} et Fe^{+++} dont la présence même aux faibles concentrations (0,05 M) modifie notablement la courbe de titrage de la PC. L'examen des courbes de titrage obtenues ne permet pas de déterminer la position du pK'_2 de la PC.

3° Le groupe des deux lanthanides étudiés, dans lequel les courbes de titrage se composent de deux branches distinctes, l'une correspondant au titrage de la PC, l'autre branche étant relative au titrage de l'ion de terre rare.

Dans chacun de ces trois cas, nous pouvons mettre en évidence la formation de complexes entre la forme di-ionisée de la PC et les différents ions étudiés.

La formation de ces complexes se manifeste selon les cas, par un abaissement du pK'_2 (premier groupe), par la décoloration d'un ion coloré (Fe^{+++}), par un retard à la précipitation de l'hydroxyde (Be^{++} , Al^{+++} , La^{+++}) ou par l'apparition d'une coloration spécifique (Ce^{+++}).

Les différences observées dans l'allure des courbes de titrage donnent à penser que la constitution de ces complexes est différente suivant l'ion métallique envisagé, la configuration de ces complexes devant dépendre étroitement de la structure électronique des ions métalliques.

L'étude des spectres d'absorption dans l'ultra-violet et le visible ainsi que des mesures de conductivité sont à faire, en particulier pour la détermination des constantes de stabilité de ces complexes.

TROISIÈME PARTIE

HYDROLYSE DE LA PHOSPHORYLCHOLINE

CHAPITRE PREMIER

CINÉTIQUE D'HYDROLYSE DE LA PHOSPHORYLCHOLINE

I. — INTRODUCTION.

On sait d'après les travaux consacrés à la synthèse de la phosphorylcholine et à l'étude de ses propriétés, que cette substance est d'une grande stabilité à l'égard des agents hydrolysants alcalins et acides. Beznak et Chain [11] avaient attribué cette stabilité à la structure « bétainique » de la PC, qu'ils considéraient comme prouvée d'après les titrages de Fischgold et Chain [27] et les déterminations de moments dipolaires de Kuhn et ses collaborateurs [38] qui conféraient toutes deux à la PC et aux phospholipides une structure cyclique en milieu apolaire (benzène) et une structure linéaire en milieu polaire (eau, alcool).

En fait, cette stabilité n'est vraiment absolue qu'en milieu alcalin, il y a une hydrolyse lente en milieu acide. Les travaux ultérieurs de Baer et MacArthur [2] montrèrent que des esters phosphoriques comme les acides glycérophosphorique ou phosphoglycérique, pour lesquels il n'existe pas de forme dipolaire possible, présentaient des propriétés identiques vis-à-vis de l'hydrolyse. Considérant que les esters de la choline, tels que la sulfurylcholine, l'acétylcholine et les lécithines sont facilement hydrolysables aussi bien en milieu acide qu'en milieu alcalin, ces auteurs en conclurent que la stabilité de la PC vis-à-vis de l'hydrolyse était due à la nature de la liaison ester phosphorique d'alcool.

Les nombreux travaux publiés par la suite confirmèrent amplement cette hypothèse.

L'hydrolyse des esters d'acides organiques ou minéraux conduit à l'acide et à l'alcool correspondants et se traduit en général par une importante diminution de pH, particulièrement marquée pour les esters d'acides forts comme les esters sulfuriques ou nitriques.

Dans le cas des monoesters de l'acide orthophosphorique, la fonction acide la plus faible est engagée dans la liaison ester. Les constantes de dissociation des deux acidités restées libres sont du même ordre de grandeur que les acidités correspondantes de l'acide orthophosphorique. Il en résulte

que l'hydrolyse d'un monoester orthophosphorique se traduit en général par de faibles variations de pH.

Cette propriété peut éventuellement être mise à profit pour l'étude de l'hydrolyse en fonction du pH, si l'on craint que l'introduction d'ions étrangers sous la forme de mélanges tampons ne vienne influencer la vitesse de la réaction, à condition de limiter l'étude à des taux d'hydrolyse faibles.

On sait en effet que l'hydrolyse des monoesters orthophosphoriques par leurs enzymes spécifiques, les phosphatases, est particulièrement sensible à la présence de divers ions (anions ou cations) intervenant par une action spécifique. Il est légitime de se demander s'il n'en est pas de même, dans une certaine mesure, pour leur hydrolyse non enzymatique.

Ce chapitre est consacré à l'étude de la cinétique d'hydrolyse non enzymatique de la PC, en fonction de différents facteurs susceptibles de l'influencer. Nous nous sommes attaché en particulier à l'étude de l'effet du pH dont on sait qu'il joue un rôle prépondérant dans l'hydrolyse des esters phosphoriques.

L'étude de la cinétique à différentes températures nous a permis de déterminer l'énergie d'activation expérimentale de la réaction, ainsi que les différentes grandeurs thermodynamiques d'activation à partir des équations de la théorie des vitesses absolues.

II. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

A) *Solutions soumises à l'hydrolyse*

Les hydrolyses ont été conduites sur des solutions de PC dont la concentration était voisine de 0,05 M. Ces solutions sont préparées à partir de solutions mères d'acide obtenues par échange d'ions du sel de magnésium $(PC)_2Mg$, ainsi que nous l'avons indiqué au chapitre 2 de la première partie.

Le pH de ces solutions est voisin de 3,6, nous les portons au pH d'hydrolyse par addition de NaOH ou HCl.

Nous avons déterminé les constantes de vitesse d'hydrolyse entre pH 1 et pH 9; pour les pH inférieurs à 1, nous avons réalisé des solutions chlorhydriques N/5, N/2, N et 2N.

L'étude de l'influence du pH sur la vitesse d'une réaction exige le maintien d'un pH aussi constant que possible pendant toute la durée d'une expérience. Ceci peut être facilement réalisé par l'utilisation de systèmes tampons. Cependant, la présence des divers constituants entrant dans la composition des tampons peut influencer la vitesse d'hydrolyse.

Cette influence peut s'exercer par une action spécifique des ions (formation de complexes, déplacements d'équilibres de dissociation), ou bien par la modification de la force ionique du milieu.

La majorité des auteurs ne reconnaissent cependant aucune influence de divers systèmes tampons et de la force ionique sur la vitesse d'hydrolyse de nombreux monoesters orthophosphoriques étudiés.

Dans une série d'expériences préliminaires nous avons déterminé les taux d'hydrolyse de la PC en milieu tamponné et non tamponné sur des solutions de même pH.

Ces expériences nous ont montré que pour des taux d'hydrolyse inférieurs à 40 %, la variation de pH reste faible, ce qui permet de déterminer une valeur approchée de la constante de vitesse.

Pour nous placer dans des conditions de pH bien définies, nous avons examiné le phénomène en présence de systèmes tampons. Nous avons observé que les pourcentages d'hydrolyse en milieu tamponné et non tamponné pour des solutions de même pH sont sensiblement égaux. Ceci démontre la non influence des constituants des tampons utilisés.

En faisant varier d'autre part la concentration des tampons, c'est-à-dire la force ionique, nous n'avons observé aucune modification de la vitesse d'hydrolyse.

L'absence d'effet de la force ionique sur la vitesse d'hydrolyse s'interprète en considérant qu'au cours de la réaction $\text{ester} + \text{eau} \rightarrow \text{alcool} + \text{phosphate}$, on assiste à une réaction dipôle-molécule polaire pour donner des composés polaires. La théorie des vitesses de réaction en solution prévoit effectivement dans ce cas la non influence de la force ionique sur la vitesse d'hydrolyse [30].

Les valeurs des pH et la composition des différents tampons utilisés pour l'hydrolyse de la PC sont les suivantes :

pH 1 à 2,2	Chlorure de potassium-acide chlorhydrique.
pH 1,1 à 4,9	Citrate de sodium-acide chlorhydrique.
pH 3,6 à 5,6	Acide acétique-soude.
pH 5,0 à 6,6	Citrate de sodium-soude.
pH 4,9 à 8,0	Phosphate monosodique-soude.
pH 7,8 à 9,2	Borate de sodium-acide chlorhydrique.

Il faut remarquer que les valeurs des pH indiquées pour ces tampons sont déterminées à la température du laboratoire. Il est évident que les pH d'hydrolyse, qui ont été conduites à 100° C, sont différents.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature les valeurs des variations de pH avec la température, des mélanges tampons aux concentrations auxquelles nous les avons utilisés. Cependant, d'après les données de Stene [62] et de Rauen [55], il résulte que sauf dans le cas des tampons borates, pour lesquels on observe des variations de pH de l'ordre de 0,3 pH pour 100° C, les variations de pH des autres tampons sont de l'ordre de quelques centièmes d'unité de pH pour une élévation de température de 100° C.

B) Conditions d'hydrolyse

Il est nécessaire de maintenir la température d'hydrolyse rigoureusement stable pendant toute la durée de l'expérience. Étant données les valeurs élevées de l'énergie d'activation des esters phosphoriques (25 à 30 kcal/mole), les constantes de vitesse sont très sensibles à des variations de température. A moins de disposer d'un système de régulation de température puissant les déterminations de constantes de vitesse risquent d'être entachées d'erreurs provenant de fluctuations de température en cours d'expérience. Nous avons mené la plupart de nos expériences à la température de 100° C. Les solutions à hydrolyser étaient introduites dans des ampoules de verre scellées plongées dans un bain d'huile dont la température était stabilisée à $\pm 0,2^\circ$ C à l'aide d'un thermostat fonctionnant en circuit fermé.

Les ampoules étaient plongées dans le bain thermostatique, elles y étaient maintenues pendant des temps variables, puis retirées et rapidement refroidies sous un courant d'eau. Nous déterminons pour chacune d'elles le degré d'hydrolyse en dosant l'orthophosphate ou la choline libérés au cours de la réaction (cf. méthodes analytiques).

III. — ÉTUDE CINÉTIQUE.

A) Détermination de la vitesse d'hydrolyse. Ordre de la réaction.

On évalue par dosage du phosphore ou de l'azote totaux la concentration initiale « a » en PC. Le dosage de l'orthophosphate ou de la choline libérés par hydrolyse permettent de déterminer la quantité « x » de PC hydrolysée par ml au bout d'un temps « t ». Les variations « a — x » de la concentration en PC sont représentées sur la figure 10; nous portons en abscisses le temps et en ordonnées $\log(a - x)$. A un pH donné, les courbes correspondant à diverses concentrations initiales en PC sont des droites de même coefficient angulaire. La réaction est donc du premier ordre.

La constante de vitesse k_1 de cette réaction :

$$k_1 = \frac{1}{t} \text{Log} \frac{a}{a - x} \quad (1)$$

est égale, au facteur 2,303 près, au coefficient angulaire α de la courbe $\log(a - x) = f(t)$: $k_1 = 2,303 \alpha$.

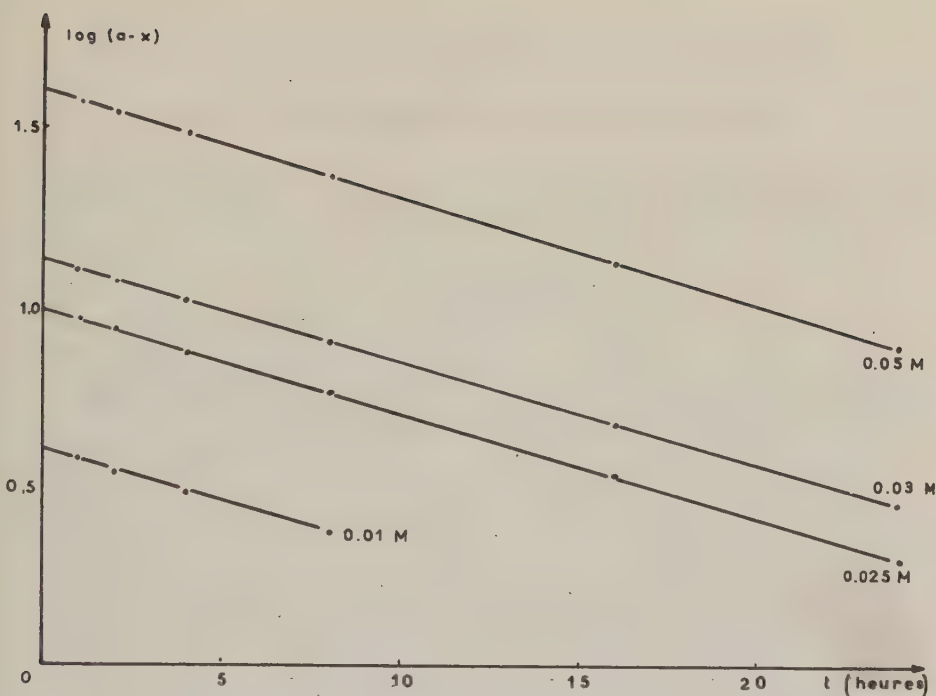


Fig. 10. — Influence de la concentration initiale en phosphorylcholine sur la vitesse d'hydrolyse, $T = 100^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 3,6$.

B) Nature de la constante k_1

Les calculs aboutissant à la relation (1) admettent pour hypothèse de départ la relation linéaire entre la vitesse d'hydrolyse et la concentration en ester : $v = k_1 \times (\text{PC})$.

En fait, la réaction d'hydrolyse s'écrit :



la vitesse de la réaction doit s'écrire dès lors :

$$v = k (\text{H}_2\text{O}) \times (\text{PC}) \quad (2)$$

Il est classique de considérer qu'au cours de la réaction (H_2O) reste pratiquement constant et égal à 55,5 et l'on pose $k_1 = k (\text{H}_2\text{O})$. On aboutit finalement à la relation (1). Il est plus commode d'intégrer le terme (H_2O) dans la constante de vitesse et de considérer la constante pseudomonomoléculaire k_1 , comme constante de vitesse de la réaction.

IV. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

A) Variations de la vitesse d'hydrolyse en fonction du pH

Les résultats des déterminations de la constante de vitesse à différents pH sont représentés par la figure 11 (page 69).

Cette figure met nettement en évidence l'influence prépondérante du pH sur la constante de vitesse d'hydrolyse. Celle-ci est nulle en milieu alcalin au-dessus de pH 8 environ, elle présente une valeur maximale en milieu faiblement acide, pH 3 à 4 ($k_1 = 17,6 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) puis elle décroît en milieu plus acide jusqu'à un minimum non nul vers pH 0,5 ($k_1 = 4,2 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) pour augmenter à nouveau lorsqu'augmente l'acidité.

Si l'on examine la courbe de titrage de la PC, on constate que le pH 8,0, au-dessus duquel on observe une hydrolyse nulle correspond sensiblement au pH de neutralisation de la deuxième acidité phosphorique. D'autre part, la zone de pH (pH 3 à 4) où s'observe le maximum de vitesse d'hydrolyse correspond à la neutralisation de la première acidité phosphorique (pH 3,6). Le calcul des concentrations des diverses espèces ioniques présentes montre qu'à pH 3,6 le groupement phosphorique de la PC se trouve pratiquement sous forme mononégative PC' . Par contre, à pH 8,0 c'est la forme dinégative PC'' que l'on trouve pratiquement seule en solution.

Ces résultats suggèrent que les vitesses d'hydrolyse des formes ioniques de la PC sont très différentes : la forme dinégative PC'' aurait une vitesse d'hydrolyse nulle, tandis que la forme mononégative PC' aurait une vitesse d'hydrolyse notable, qui semble déterminer la vitesse de la réaction. La forme non ionisée PC^0 aurait une vitesse d'hydrolyse faible.

B) Discussion

Si l'on désigne par $|\text{PC}^0|$, $|\text{PC}'|$ et $|\text{PC}''|$ les concentrations respectives des formes non ionisée, mono-ionisée et di-ionisée de la PC, la vitesse d'hydrolyse s'écrit d'une manière générale :

$$v = \frac{-d|\text{PC}|}{dt} = \frac{-d|\text{PC}^0|}{dt} + \frac{-d|\text{PC}'|}{dt} + \frac{-d|\text{PC}''|}{dt} \quad (3)$$

La vitesse d'hydrolyse observée est la somme des vitesses des différentes formes ioniques :

$$k_{\text{exp}}(\text{PC}) = k_1^0 |\text{PC}^0| + k_1' |\text{PC}'| + k_1'' |\text{PC}''| \quad (4)$$

soit

$$k_{exp} = k_1^0 \frac{[PC^0]}{[PC]} + k_1' \frac{[PC']}{[PC]} + k_1'' \frac{[PC'']}{[PC]} \quad (4 \text{ bis})$$

Dans cette expression les grandeurs k_1^0 , k_1' et k_1'' représentent les constantes de vitesse d'hydrolyse spécifiques du premier ordre des formes ioniques PC^0 , PC' et PC'' .

Les termes $\frac{-d[PC^0]}{dt}$, $\frac{-d[PC']}{dt}$ et $\frac{-d[PC'']}{dt}$ résultent de l'évolution des différentes espèces ioniques, d'une part par hydrolyse en donnant l'orthophosphate et la choline, d'autre part par mise en équilibre d'ionisation avec les autres formes :



La relation (4 bis) peut se simplifier moyennant certaines hypothèses et si l'on considère les différents domaines de pH.

1° Hydrolyse entre pH 0 et pH 3,6.

C'est le domaine de pH où les formes PC^0 et PC' sont en équilibre. La forme PC'' est inexistante et la relation (4 bis) se réduit à l'expression :

$$k_{exp} = k_1^0 \frac{[PC^0]}{[PC]} + k_1' \frac{[PC']}{[PC]} \quad (5)$$

Si on admet que la vitesse d'hydrolyse de la forme PC^0 est négligeable cette relation se réduit à :

$$k_{exp} = k_1' \frac{[PC']}{[PC]} \quad (6)$$

2° Hydrolyse entre pH 3,6 et 8,0.

Les formes en présence dans ce domaine de pH sont exclusivement les formes PC' et PC'' et l'on a, en tenant compte du fait que $k'' = 0$:

$$k_{exp} = k_1' \frac{[PC']}{[PC]} \quad (7)$$

Dans cette relation k_1' n'est autre que la constante de vitesse maximum : $k_1' = 17,6 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Les concentrations des différentes formes ioniques

en fonction du pH, sont facilement accessibles à l'expérience, il suffit pour cela de se référer aux courbes de titrage de la PC. On pourra donc déterminer théoriquement la constante de vitesse d'hydrolyse à un pH particulier.

C) Détermination théorique de la courbe d'hydrolyse

Il s'agit de calculer le rapport ($|PC'|/|PC|$) à différents pH. L'équilibre de dissociation d'un diacide $AH_2 \rightleftharpoons AH^- + H^+$ se traduit par la relation :

$$K'_1 = \frac{|AH^-| (H^+)}{|AH_2|} \quad (8)$$

dans laquelle $|AH^-|$ et $|AH_2|$ représentent respectivement les concentrations des acides dissocié et non dissocié. Ces deux concentrations sont reliées à la concentration totale c en acide par la relation :

$$c = |AH^-| + |AH_2| \quad (9)$$

Le rapport X de la concentration en acide dissocié à la concentration totale en acide s'écrit :

$$X = \frac{|AH^-|}{|AH_2| + |AH^-|} = \frac{1}{1 + H^+/K'_1} \quad (10)$$

La deuxième dissociation de l'acide est représentée par l'équilibre $AH^- \rightleftharpoons A^{--} + H^+$, avec :

$$K'_2 = \frac{|A^{--}| (H^+)}{|AH^-|} \quad (11)$$

Le rapport de la concentration de la forme mono-ionisée à la concentration totale en acide est alors égal à :

$$X = \frac{|A^-|}{|A^-| + |A^{--}|} = \frac{1}{1 + \frac{K'_2}{H^+}} \quad (12)$$

Les valeurs des pK' ont été déterminées précédemment :

$$pK'_1 = 1,47 \quad (K_1 = 3,39 \cdot 10^{-2}),$$

$$pK'_2 = 5,85 \quad (K'_2 = 1,41 \cdot 10^{-6}).$$

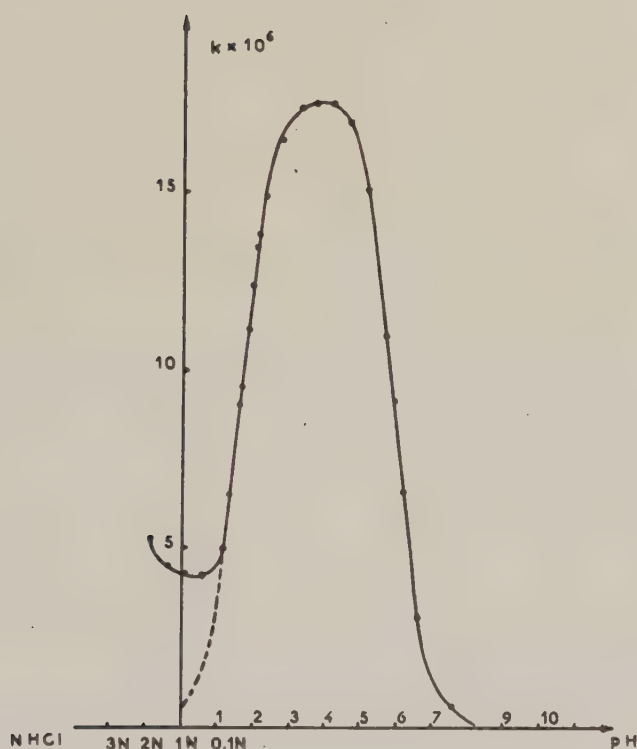


Fig. 11. — Influence du pH sur la vitesse d'hydrolyse à 100°C de la phosphorylcholine.

Abscisses : pH; ordonnées : constante de vitesse (s^{-1}).

La figure 11 représente la courbe des variations de la constante de vitesse calculée à partir des relations (6) et (7). On voit que les points expérimentaux se répartissent sur cette courbe entre pH 2 et pH 8. En dessous de pH 2, les valeurs expérimentales de la constante de vitesse décroissent jusqu'à pH 0,5 environ, puis augmentent en milieu plus acide, alors que les valeurs calculées décroissent régulièrement pour atteindre la valeur $0,52 \cdot 10^{-6}$ à pH 0. Pour expliquer les divergences observées entre ces deux courbes, il faut considérer qu'entre pH 0 et 1, la PC existe probablement sous forme d'acide conjugué possédant une vitesse d'hydrolyse notable. Ceci montre indirectement que la vitesse de la forme non ionisée est faible, ce qui explique le minimum observé vers pH 0,5.

Tableau I
Comparaison des valeurs expérimentales et calculées
de k_1 en fonction du pH

— pH < 3,6

pH	0	0,5	1,0	1,5	2	2,2
$k_1 \text{ exp.} \times 10^5$	0,45	0,44	0,50	0,96	1,38	1,49
$k_1 \text{ calc.} \times 10^5$	0,052	0,17	0,45	0,91	1,35	1,49

— pH > 3,6

pH	5,0	5,5	6	6,5	7,0	7,5
$k_1 \text{ exp.} \times 10^5$	1,51	1,10	0,67	0,37	—	0,03
$k_1 \text{ calc.} \times 10^5$	1,53	1,21	0,72	0,31	0,11	0,08

Il est intéressant de comparer la vitesse d'hydrolyse maximum de la PC avec celle d'autres esters phosphoriques typiques.

Tableau II
Vitesses d'hydrolyses comparées des formes mono-ionisées
de quelques esters phosphoriques

Ester	$k \times 10^6 \text{ (sec}^{-1}\text{)}$	Références
Méthyl-P	8,23	[14]
Éthyl-P	6,08	[67]
Hydroxy-éthyl-P	12,2	[24]
Ac. Phosphoglycolique	35	[24]
Aminoéthyl-P	30,7	[64]
1-glycéro-P	13,5	[64]
2-glycéro-P	27,7	[64]
Phényl-P	22,5	[67]
Amino-1 propyl-2-P	32	[20]
Choline-P	17,6	

L'examen du tableau II, permet de constater que dans la série des esters phosphoriques éthyl-substitués (hydroxy-éthyl, acide phosphoglycolique, amino-éthyl [AEP]) la présence de la charge positive dans les molécules de PC et de AEP provoque une augmentation de la vitesse

d'hydrolyse de la forme mono-ionisée par rapport à celle de l'éthyl-phosphate ($k = 6,08.10^{-6}$). Cette augmentation est beaucoup plus marquée dans le cas de l'AEP ($k = 30,7.10^{-6}$) que dans celui de la PC ($k = 17,6.10^{-6}$).

On sait que le site de la réaction hydrolytique est l'atome de phosphore électrophile, et que la scission nucléophile s'opère au niveau de la liaison P-O. L'attaque par l'eau sera d'autant plus facilitée que la charge positive partielle de l'atome de phosphore sera plus grande.

Dans le cas que nous venons d'examiner les groupements $-^+NH_3$ et $-^+N(CH_3)_3$ sont fortement attracteurs d'électrons et sont susceptibles d'augmenter ainsi par un effet inductif la charge positive partielle de l'atome de phosphore. Le groupe $-^+NH_3$ est plus attracteur d'électrons que le groupement $-^+N(CH_3)_3$ par suite de l'effet donneur d'électrons des méthyles, ce qui permet d'expliquer la différence des vitesses d'hydrolyse observée.

Cette hypothèse pourrait être extrêmement utile dans un essai d'interprétation du mécanisme d'action des phosphatases; les enzymes interviendraient en venant augmenter la charge positive partielle de l'atome de phosphore.

Les résultats obtenus sont conformes à ceux connus pour la plupart des monoesters orthophosphoriques d'alcools.

Ils se caractérisent par :

- un maximum de vitesse vers pH 4,0, correspondant au pH de neutralisation de la première acidité phosphorique,
- une assez grande stabilité en milieu acide vers pH 0,5,
- une stabilité pratiquement totale en milieu alcalin au-dessus de pH 8,0.

L'interprétation que nous en donnons est basée sur l'hydrolyse pratiquement exclusive de la forme mono-ionisée.

V. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE.

A) *Rappels*

On sait que l'augmentation de la vitesse d'une réaction avec la température, résulte principalement de l'augmentation du nombre de molécules activées. En effet, toutes les molécules du milieu réactionnel ne sont pas susceptibles de réagir pour donner les produits de la réaction. Seul un nombre limité d'entre elles, dites molécules activées, possédant un excès d'énergie égal ou supérieur à une certaine énergie E_A par rapport aux molécules situées aux niveaux les plus bas, jouissent de cette propriété.

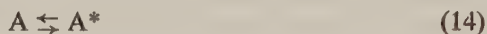
L'énergie E_A est dite énergie d'activation expérimentale, elle est reliée à la température par la relation classique :

$$k = A e^{-E_A/RT} \quad (13)$$

dans laquelle k désigne la constante de vitesse de la réaction, A une constante dépendant peu de la température souvent désignée sous le nom de facteur de fréquence, R la constante des gaz parfaits et T la température absolue de la réaction.

La théorie des vitesses absolues ou du complexe activé apporte dans ce domaine des renseignements supplémentaires et permet de déterminer la nature des grandeurs A et E_A .

On admet, dans cette théorie, qu'il existe un véritable équilibre chimique :



entre les molécules normales A et le complexe activé A^* . Cet équilibre est caractérisé par une constante d'équilibre K^* et obéit à la loi d'action de masse :

$$K^* = \frac{(A^*)}{(A)} \quad (15)$$

Une fois formé, le complexe activé se décompose avec une fréquence universelle égale à kT/h dans laquelle k représente la constante de Boltzmann, $k = 1,38 \cdot 10^{-16}$ erg/°C et h la constante de Planck, $h = 6,62 \cdot 10^{-27}$ erg/s. D'autre part, la probabilité pour que le complexe se dissocie pour donner les produits de la réaction, est représentée par un coefficient de transmission en général voisin de l'unité. La fréquence de décomposition du complexe est donc représentée par la relation :

$$k = \frac{kT}{h} K^* \quad (16)$$

k n'est autre que la constante de vitesse de la réaction. On définit les différentes grandeurs thermodynamiques d'activation relatives à l'équilibre (14).

La variation d'énergie libre d'activation est :

$$\Delta F^* = - RT \log K^* \quad (17)$$

Cette énergie libre d'activation est reliée à l'enthalpie d'activation ΔH^*

et à la variation d'entropie d'activation ΔS^* par la relation classique de thermodynamique :

$$\Delta F^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (18)$$

La relation (17) s'écrit alors :

$$K^* = e^{-\Delta F^*/RT} = e^{-\Delta H^*/RT} e^{\Delta S^*/R} \quad (19)$$

et en portant dans (16) :

$$k = \frac{kT}{h} e^{-\Delta H^*/RT} e^{\Delta S^*/R} \quad (20)$$

Pour les réactions en solution, l'énergie d'activation expérimentale E_A est reliée simplement à la variation d'enthalpie d'activation par la relation :

$$E_A = \Delta H^* + RT \quad (21)$$

La relation (20) s'écrit dans ce cas :

$$k = e \frac{kT}{h} e^{-E_A/RT} e^{\Delta S^*/R} \quad (22)$$

Si on identifie l'expression (22) à l'équation d'Arrhénius, on obtient :

$$A = e \frac{kT}{h} e^{\Delta S^*/R} \quad (23)$$

B) Résultats expérimentaux

Nous avons déterminé les constantes de vitesse de l'hydrolyse de la PC à 80° C, 90° C et 100° C. Nous avons étudié l'effet de la température sur des solutions de pH différents, c'est-à-dire à différentes concentrations des diverses formes ioniques (figure 12).

Dans le domaine de température étudié et pour des solutions de pH 3,5 et 5,3, les variations de $\log k_1$ en fonction de $1/T$ sont des droites parallèles. Leur pente commune permet de calculer l'énergie d'activation expérimentale E_A de la réaction.

On obtient ainsi $E_A = (27 \pm 2)$ kcal/mole. Les équations de la théorie des vitesses absolues permettent de calculer les valeurs correspondantes de ΔF^* , ΔH^* , ΔS^* .

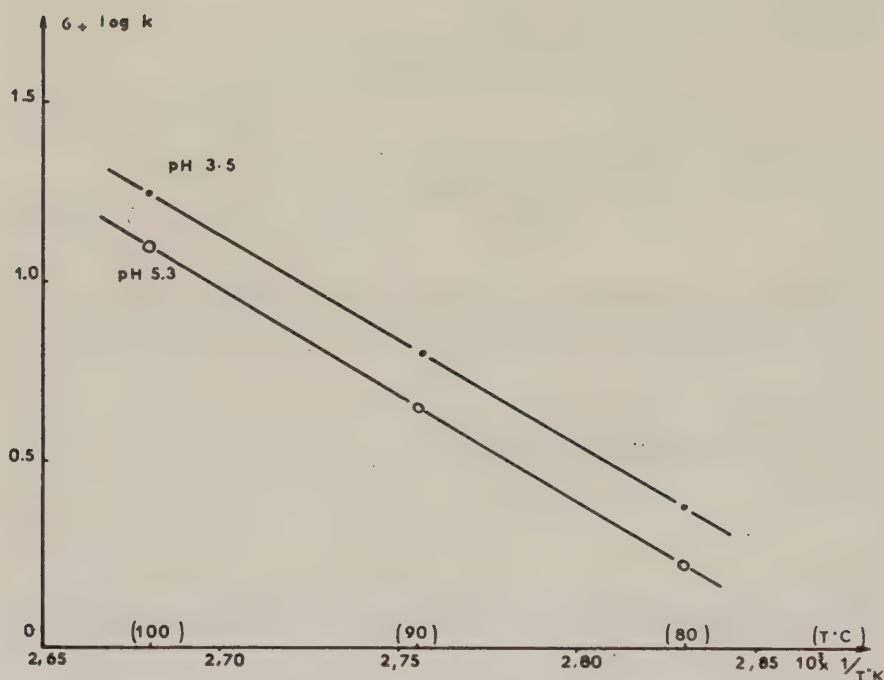


Fig. 12. — Influence de la température sur la vitesse d'hydrolyse de la phosphorylcholine.

Abscisses : $10^3 \times 1/T^\circ K$; ordonnées : $\log (k \cdot 10^6)$.

La connaissance de la constante de vitesse k_1 à plusieurs températures permet d'évaluer ces différentes grandeurs :

$$\Delta F^* = - RT \log k - \log \frac{kT}{h} \quad (24)$$

$$\Delta H^* = E_A - RT \quad (25)$$

$$\Delta S^* = \frac{1}{T} (\Delta H^* - \Delta F^*) \quad (26)$$

Les valeurs obtenues sont consignées dans le tableau ci-après.

Tableau III

Valeurs des différentes grandeurs thermodynamiques
d'activation de la PC

pH	E _A kcal/mole	ΔH* kcal/mole	ΔH* kcal/mole	ΔS* cal/mole/ degré
3,5	27 ± 2	30,2	26,3 ± 2	— 10,6 ± 5,4
5,3	27 ± 2	30,6	26,3 ± 2	— 11,5 ± 5,4

L'énergie d'activation de nombreuses réactions d'hydrolyse non enzymatiques est comprise entre 25 et 30 kcal/mole. Selon Van Wazer [66] la valeur de cette énergie implique la rupture de la liaison C-O-P pour les esters orthophosphoriques ou de la liaison P-O-P pour les esters polyphosphoriques. L'énergie d'activation de la scission hydrolytique des liaisons C-O-C des éthers-oxydes est supérieure d'environ 5 kcal/mole; par contre lors de la rupture de la liaison C-O-C des esters aliphatiques d'acides organiques et de l'anhydride acétique, les énergies d'activation sont beaucoup plus basses (10 à 12 kcal/mole).

Tableau IV

Valeurs de l'énergie d'activation expérimentale
de l'hydrolyse de quelques esters phosphoriques

Ester	E _A kcal/mole	Références
Méthyl-P	30,6	(67)
Phényl-P	28,3	(67)
p-nitrophényl-P	29,7	(67)
Glucose-1-P	30,0	(67)
1-glycéro-P	29,9	(64)
2-glycéro-P	30,3	(64)
Amino-éthyl-P	29,6	(64)

Le tableau IV représente les valeurs des énergies d'activation de quelques esters phosphoriques. La valeur que nous obtenons pour la PC est du même ordre que celles qui ont été déterminées pour ces esters.

V. — CONCLUSIONS.

L'étude cinétique de l'hydrolyse de la PC en fonction du pH montre que la réaction est du premier ordre par rapport à l'ester. La vitesse d'hydrolyse n'est pas influencée par la présence des divers mélanges tampons, ni par la force ionique du milieu.

L'étude de l'influence du pH sur la constante de vitesse montre que celle-ci présente un maximum vers pH 4, elle est nulle en milieu alcalin à partir de pH 8 et présente un minimum en milieu acide vers pH 0,5. La vitesse d'hydrolyse est réglée par la concentration de la forme mono-ionisée entre pH 2 et pH 8,0. La réaction suit de façon satisfaisante la loi d'Arrhénius, l'énergie d'activation expérimentale étant égale à 27 ± 2 kcal/mole.

CHAPITRE II

HYDROLYSE EN PRÉSENCE D'IONS MÉTALLIQUES

I. — INTRODUCTION.

L'étude du rôle des ions métalliques dans les réactions enzymatiques constitue un problème important pour l'interprétation des phénomènes biologiques qui dépendent de ces réactions.

Dans une réaction enzymatique donnée, un ion métallique peut s'associer à l'enzyme, au substrat, ou à la fois à l'enzyme et au substrat. Dans ce cas, il vient jouer le rôle d'un pont pour donner un composé ternaire enzyme-métal-substrat. Les liaisons formées présentent le plus souvent un caractère covalent et résultent de la mise en commun des électrons de certains groupes de la protéine enzymatique ou du substrat avec l'ion métallique [36].

L'action catalytique d'un ion métallique sur une réaction enzymatique peut s'exercer de deux manières différentes. Il peut intervenir en modifiant la forme de la protéine enzymatique de manière à la rendre plus apte à réagir avec le substrat, ou bien il peut faire partie d'un des sites actifs de l'enzyme [26].

Dans le cas de l'activation d'une réaction quelconque par des ions métalliques, on considère que le mécanisme par lequel l'ion métallique provoque certains changements sur les molécules de substrat est une conséquence directe de sa charge. Du fait de sa forte électropositivité, il a pour effet d'attirer des électrons et de rendre ainsi certaines liaisons plus fragiles [68].

Dans un certain nombre de cas, on observe une action de l'ion métallique sur le substrat seul, en absence d'enzyme, ce qui permet parfois d'expliquer le mécanisme d'une réaction. C'est ainsi que les ions Mg^{++} , activateurs classiques des phosphatases, catalysent l'hydrolyse en milieu alcalin de l'acétyl-phosphate [37] et de l'ATP [45] aussi bien en l'absence qu'en présence de l'enzyme correspondante. Cette activation est attribuée à l'existence de complexes entre les ions Mg^{++} et ces composés.

Par contre, dans le cas de la phosphoglucomutase, qui réalise la transformation du glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate, les ions Mg^{++} , activateurs de cette enzyme, sont parfaitement inactifs en son absence, même en présence du glucose-1-6-diphosphate qui est un intermédiaire de la réaction enzymatique [52].

Un exemple frappant de catalyse non enzymatique par des ions métalliques est celui de l'hydrolyse alcaline des monoesters orthophosphoriques par les gels d'hydroxydes de terres rares. On sait en effet, que les esters phosphoriques sont extrêmement stables à l'hydrolyse en milieu alcalin, alors qu'ils sont très sensibles à l'action des diverses phosphatases alcalines. L'hydrolyse non enzymatique de ces esters devient notable en milieu alcalin lorsqu'ils sont en présence de gels d'hydroxydes de lanthane ou de cérium [15]. Bien que ces métaux ne soient pas d'intérêt biologique, l'étude de leur action a pu permettre de donner une interprétation du mécanisme d'action des phosphatases alcalines et de proposer des modèles d'enzymes [8].

Nous nous sommes proposé d'étudier dans ce chapitre l'action de différents ions métalliques connus comme activateurs ou inhibiteurs des phosphatases, sur l'hydrolyse non enzymatique de la PC, ainsi que l'action des ions La^{+++} , Ce^{+++} et Ce^{++++} en milieu neutre ou faiblement alcalin.

Les conditions générales d'hydrolyse sont les suivantes :

Excepté dans le cas des ions lanthane et cérium, les hydrolyses ont été conduites à $100^{\circ} \pm 0,2^{\circ} C$ en ampoules scellées sur des solutions 0,05 M en PC et 0,5 M en ions métalliques.

Au cours de l'hydrolyse en présence d'ions métalliques, la réaction s'accompagne de la formation du phosphate correspondant et se traduit généralement par la formation d'un précipité ou d'un dépôt sur les parois de l'ampoule. La récupération du phosphate formé, en vue du dosage, pose des difficultés techniques; c'est pourquoi nous avons préféré procéder par dosage de la choline libérée par hydrolyse. Les hydrolyses en présence des ions La^{+++} et Ce^{+++} ont été conduites à $80^{\circ} \pm 0,1^{\circ} C$. Les concentrations de la PC et de ces ions étaient équimoléculaires.

II — HYDROLYSE EN PRÉSENCE D'IONS Mg^{++} .

Les ions Mg^{++} sont les activateurs par excellence des phosphatases, leur effet est généralement attribué à une grande affinité pour les groupements phosphoriques $-PO_3^-$ [44].

L'étude de la cinétique d'hydrolyse à $100^{\circ} C$ de la PC en concentration 0,05 M en présence d'ions Mg^{++} en concentration 0,5 M à différents pH

montre que les variations de la fonction $\log(a - x) = f(t)$ sont linéaires. La réaction est donc du premier ordre comme en l'absence d'ions métalliques.

La courbe des variations de la constante de vitesse en fonction du pH a le même profil que celle obtenue en l'absence d'ions Mg^{++} . Elle en diffère cependant sur différents points.

L'hydrolyse devient pratiquement nulle au-dessus de pH 7 environ, alors qu'en l'absence d'ions Mg^{++} elle s'annule seulement vers pH 8. D'autre part, la vitesse maximum d'hydrolyse se situe vers pH 2 à 3, au lieu de pH 3 à 4. On observe en même temps une légère diminution de la vitesse maximale. Sa valeur est égale à $14,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ en l'absence d'ions Mg^{++} .

La courbe de titrage de la PC 0,05 M en présence d'ions Mg^{++} en concentration 0,5 M montre d'autre part que la première acidité de la PC est neutralisée vers pH 2,8, la deuxième acidité vers pH 7, le pH de demi-neutralisation se situant vers pH 4,8.

La vitesse d'hydrolyse à ce pH ($k = 7,1 \cdot 10^{-6}$) est sensiblement égale à la moitié de la vitesse maximum ($k = 14,1 \cdot 10^{-6}$). Les valeurs expérimentales de la constante de vitesse k se groupent avec un bon accord sur la courbe $k = f(\text{pH})$ déterminée à partir de l'équation $k = k_{\text{max}} \times PC'/PC$, entre pH 2 et pH 6,5 environ.

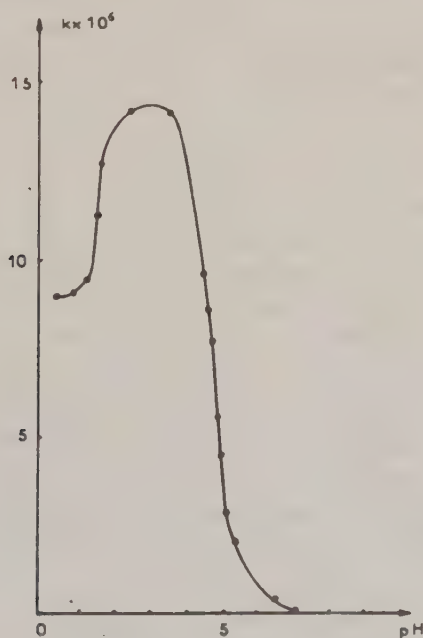


Fig. 13. — Courbe d'hydrolyse à 100°C en fonction du pH, de la phosphorylcholine en présence d'ions Mg^{++} 0,5M.

Abscisses : pH; ordonnées : constante de vitesse (s^{-1}).

Tableau I
Valeurs expérimentales et calculées de la constante de vitesse
en présence d'ions Mg^{++} 0,5M

pH	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5
k exp. $\times 10^6$	12,3	9,5	5,5	2,1	0,9	0,03
k calc. $\times 10^6$	12,1	9,4	5,5	2,3	0,8	0,03

Il existe donc la même relation de proportionnalité qu'en l'absence d'ions Mg^{++} entre la vitesse d'hydrolyse à un pH donné et la vitesse maximale.

Le parallélisme qui existe entre les variations de la constante de vitesse k et la concentration de la forme mono-ionisée montre que l'hydrolyse est réglée entre pH 2 et pH 7 par la seule forme mono-ionisée, comme en l'absence d'ions Mg^{++} .

La fraction de la forme di-ionisée qui se trouve complexée par les ions Mg^{++} ne semble pas être hydrolysée à une vitesse appréciable. L'étude de l'hydrolyse dans la région de pH optimum, en présence de différentes concentrations en ions Mg^{++} , montre que la valeur de la constante de vitesse diminue lorsqu'on augmente la concentration des ions Mg^{++} .

Les ions Mg^{++} ne semblent donc pas intervenir directement dans la cinétique et les résultats obtenus sont différents de ceux signalés par Koshland [37] pour l'hydrolyse alcaline de l'acétylphosphate. Celle-ci se déroule suivant une cinétique du premier ordre par rapport à l'ester et du premier ordre par rapport aux ions Mg^{++} , en même temps qu'on observe une activation notable de l'hydrolyse par ces ions.

Il en est de même pour l'hydrolyse de l'ATP qui est activée, en milieu alcalin, par les ions Mg^{++} . Ainsi que le signalent Liebecq et ses collaborateurs [45], l'activation est maximale pour un rapport Mg/ATP égal à 2 et se maintient à la même valeur jusqu'à un rapport Mg/ATP égal à 5. Le rapport optimum correspond à la formation d'un complexe $ATPMg_2$. Les ions Mg^{++} n'ont aucune influence en milieu acide. Les résultats que nous obtenons pour la PC ne montrent aucune activation en milieu alcalin par les ions Mg^{++} . Les taux d'hydrolyse que nous observons entre pH 7 et 9 sont tout à fait comparables à ceux obtenus en l'absence d'ions Mg^{++} .

Les phénomènes qui se produisent sont trop lents pour que l'on puisse mettre en évidence une éventuelle activation par les ions Mg^{++} en milieu alcalin.

III. — HYDROLYSE EN PRÉSENCE D'IONS Zn^{++} .

L'étude de la cinétique d'hydrolyse de la PC (0,05M) en présence

d'ions Zn^{++} 0,5M montre que la réaction, entre pH 1 et 5, est du premier ordre comme en l'absence de ces ions.

L'allure de la courbe des variations de la constante de vitesse en fonction du pH est la même que celle obtenue en l'absence d'ions Zn^{++} , mais elle en diffère sur les points suivants :

— l'hydrolyse est nulle au-dessus de pH 6 environ au lieu de pH 8, ce pH coïncide avec le début de précipitation de l'hydroxyde $\text{Zn}(\text{OH})_2$ en présence de PC,

— elle présente un maximum vers pH 2 à 3 au lieu de 3 à 4.

La constante de vitesse maximum est égale à $0,78 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ au lieu de $1,75 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ en l'absence d'ions Zn^{++} , mettant ainsi en évidence un effet inhibiteur notable de ces ions sur la réaction. La courbe de titrage de la PC en présence d'ions Zn^{++} montre que la première acidité de la PC est neutralisée vers pH 3, la deuxième acidité vers pH 5,7, le pH de demi-neutralisation se situant vers pH 4,2.

La constante de vitesse à ce pH ($k = 0,38 \cdot 10^{-5}$) est sensiblement égale à la moitié de la valeur maximum ($k = 0,78 \cdot 10^{-5}$). Comme dans le cas des ions Mg^{++} , les points expérimentaux se situent sensiblement sur la courbe déterminée à partir de l'équation :

$$k = k_{m_{\text{PC}}} \frac{\text{PC}'}{\text{PC}}$$

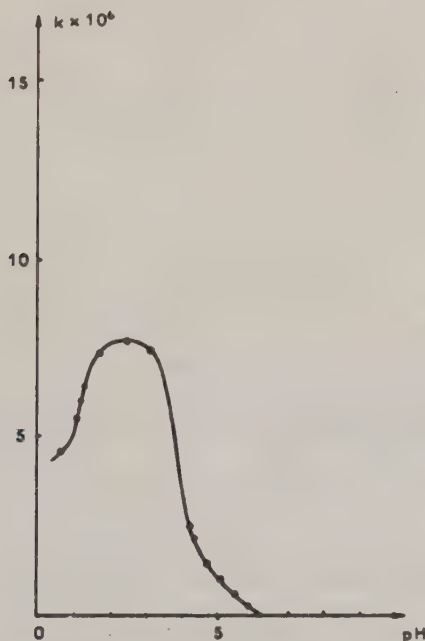


Fig. 14. — Courbe d'hydrolyse à 100°C en fonction du pH, de la phosphorylcholine en présence d'ions Zn^{++} 0,5M.

Abscisses : pH; ordonnées : constante de vitesse (s^{-1}).

IV. — HYDROLYSE EN PRÉSENCE D'IONS Ca^{++} .

La figure 15 représente les variations de la constante de vitesse en présence d'ions Ca^{++} en fonction du pH. La courbe a la même allure que celles obtenues avec les ions Mg^{++} et Zn^{++} .

Elle présente un optimum vers pH 3, la valeur de la constante de vitesse y est égale à $1,31 \cdot 10^{-5}$, soit une valeur très légèrement inférieure à celle observée avec les ions Mg^{++} .

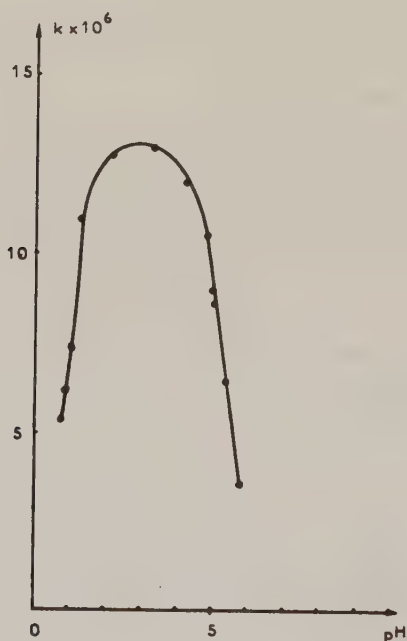


Fig. 15. — Courbe d'hydrolyse à 100°C en fonction du pH, de la phosphorylcholine en présence d'ions Ca^{++} 0,5M.

Abscisses : pH; ordonnées : constante de vitesse (s^{-1}).

V. — HYDROLYSE EN PRÉSENCE D'IONS Be^{++} .

Les ions Be^{++} sont les inhibiteurs types des phosphatases alcalines, leur effet est attribué à la grande affinité qu'ils possèdent vis-à-vis des ions OH^- empêchant ainsi une attaque par ces ions.

On retrouve cette propriété pour l'hydrolyse non enzymatique de la PC. La vitesse d'hydrolyse en présence d'ions Be^{++} en concentration 0,5M est considérablement ralentie. La réaction demeure du premier ordre. La constante de vitesse devient pratiquement nulle au-dessus de pH 3,5 (10% d'hydrolyse en 456 h à 100° C, $k = 0,7 \cdot 10^{-7}$). Elle croît jusqu'à pH 1,2 tout en restant beaucoup plus faible qu'en l'absence d'ions Be^{++} ($k = 0,09 \cdot 10^{-5}$ au lieu de $0,53 \cdot 10^{-5}$). Nous n'avons pas pu mettre en évidence un pH optimum d'hydrolyse.

L'effet que nous observons est le même que celui signalé par Liébecq pour l'hydrolyse non enzymatique de l'ATP en présence d'ions Be^{++} [45].

Hydrolyse à 100° C en présence d'ions Be^{++} 0,5M. pH=1,4

Durée d'hydrolyse	24 H	48 H	96 H
Pourcentage	5,6	11	20,5
$k \times 10^7$	6,67	6,71	6,67

VI. — HYDROLYSE EN PRÉSENCE D'IONS Fe^{+++} et Al^{+++} .

Ces ions ne sont pas des effecteurs spécifiques des phosphatases, mais avant d'aborder l'étude de l'hydrolyse en présence de lanthanides, nous avons voulu examiner l'influence de quelques ions trivalents.

Les hydrolyses en présence de ces ions étant très lentes, nous n'avons pas examiné toute l'étendue du pH, mais seulement réalisé quelques hydrolyses à des pH particuliers.

Nos résultats nous montrent que les ions Fe^{+++} et Al^{+++} inhibent fortement l'hydrolyse non enzymatique de la PC.

En présence d'ions Fe^{+++} 0,5M, l'hydrolyse semble se dérouler toujours suivant une cinétique du premier ordre. A pH 1,1 la constante de vitesse est $0,42 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (30 % d'hydrolyse en 240 heures à 100° C) au lieu de $9 \cdot 10^{-6}$ en l'absence de ces ions. La constante de vitesse observée est environ vingt fois plus faible, ce qui montre un effet inhibiteur puissant de l'hydrolyse par les ions Fe^{+++} .

Hydrolyse à pH 1,1 en présence d'ions Fe^{+++} 0,5M, T = 100° C.

Durée d'hydrolyse	25 H	90 H	240 H
Pourcentage	9,7	13,1	30,6
$k \times 10^7$	4,25	4,30	4,21

Les ions Al^{+++} inhibent également l'hydrolyse de la PC. A pH 2,05 et en concentration 0,25M, on obtient une constante de vitesse du premier ordre voisine de $3,6.10^{-7} \text{ s}^{-1}$, au lieu de $1,4.10^{-5}$ en l'absence d'ions Al^{+++} . La vitesse d'hydrolyse à ce pH se trouve ralentie d'environ quarante fois.

VII. — DISCUSSION.

Les ions métalliques dont nous venons d'étudier l'influence sur la vitesse d'hydrolyse de la PC à 100° C , peuvent se classer en deux catégories, suivant l'action qu'ils exercent.

Nous considérons dans un premier groupe les ions dont la présence se traduit par un déplacement de la courbe d'hydrolyse en fonction du pH vers les pH acides avec une légère diminution de la vitesse maximum d'hydrolyse. Le décalage observé entre les courbes d'hydrolyse en présence ou en l'absence d'ions métalliques correspond sensiblement à l'abaissement de la courbe de titrage de la PC provoqué par la formation de complexe entre la forme di-ionisée de l'ester $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPO}_3^{--}$ et les ions métalliques. Ces ions sont Mg^{++} , Ca^{++} et Zn^{++} . Ce sont précisément ceux dont la présence ne modifie pas la forme même de la courbe de titrage de la PC, mais se traduit par un simple abaissement d'ensemble de la courbe de titrage vers les pH acides.

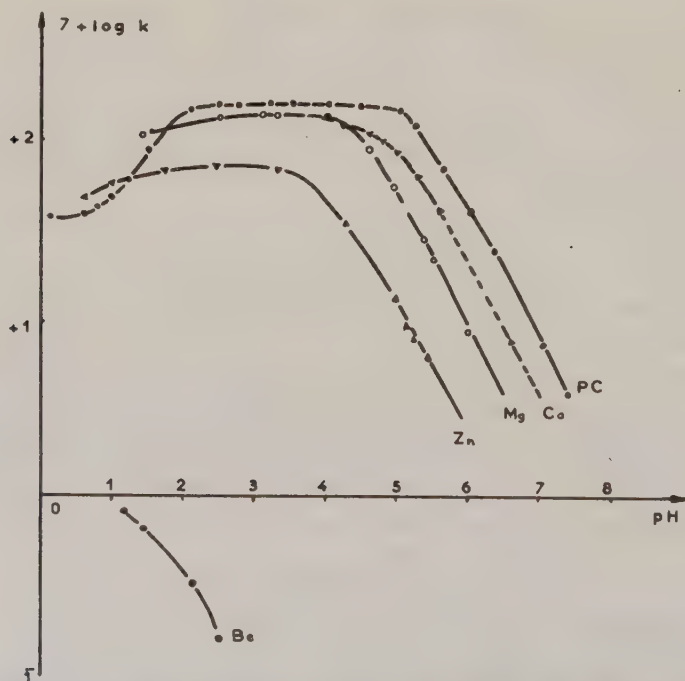


Fig. 16. — Influences comparées des ions Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} et Be^{++} sur la vitesse d'hydrolyse de la phosphorylcholine, en fonction du pH.

Abscisses : pH; ordonnées : $\log (k. 10^7)$.

On observe dans les trois cas une diminution de la vitesse maximum d'hydrolyse, l'ordre d'inhibition décroissant étant :



Il est intéressant de remarquer que cet ordre est le même que l'ordre de stabilité décroissante des complexes de PC correspondants qui est :



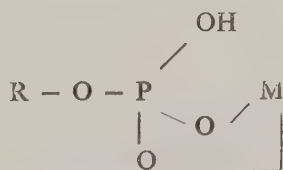
On n'observe aucun effet notable en milieu alcalin.

Le second groupe d'ions métalliques est celui des ions Be^{++} , Fe^{+++} et Al^{+++} . Leur point commun est l'effet inhibiteur puissant qu'ils exercent sur l'hydrolyse de la PC. Ces ions métalliques sont précisément ceux dont la présence modifie la courbe de titrage de la PC. L'allure des courbes de titrage semble indiquer que les complexes formés entre la PC et les ions Be^{++} , Fe^{+++} et Al^{+++} sont particulièrement forts par rapport aux complexes de magnésium, de calcium ou de zinc; de même que la stabilité du complexe ferrique de l'orthophosphate est nettement plus grande que les stabilités correspondantes des complexes de magnésium ou de calcium (environ 10^7 fois).

Il semble donc, que plus le complexe formé est fort, plus l'hydrolyse est entravée par la présence de l'ion métallique.

Comment expliquer les faits observés ?

Si l'on admet que l'hydrolyse est d'autant plus aisée que la charge positive partielle sur l'atome de phosphore est plus grande, on peut rendre compte de l'inhibition de l'hydrolyse par les ions Be^{++} , Al^{+++} et Fe^{+++} en supposant l'existence d'un composé de la forme :

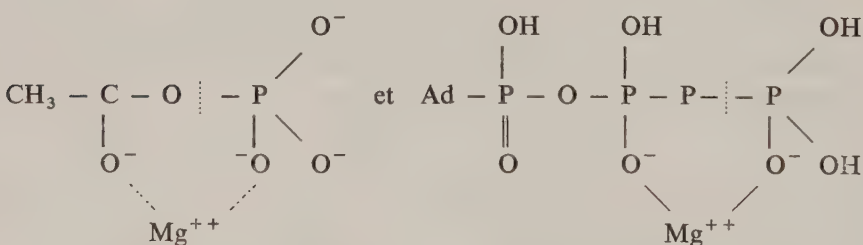


L'ion métallique peut se lier par une de ses coordinances à l'oxygène du groupe $\overset{\delta+}{\text{P}} = \overset{\delta-}{\text{O}}$. Du fait de sa charge, il a tendance à attirer les électrons et à diminuer ainsi la charge positive partielle de l'atome de phosphore. Un autre facteur important peut expliquer le ralentissement de l'hydrolyse : l'hydratation des ions métalliques. Aux concentrations utilisées, les ions métalliques sont susceptibles de s'entourer d'un grand nombre de molécules d'eau qui sont les agents de la réaction.

Dans aucun des cas étudiés nous n'avons observé une activation par les ions métalliques utilisés. Pourtant, les ions Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} favorisent l'hydrolyse non enzymatique de l'ATP[45], les ions Mg^{++} celle de l'acétylphosphate [37]. Ces activations sont attribuées à la formation de complexes entre ces dérivés phosphorés et les ions métalliques.

Il semble que la formation d'un complexe ne suffise pas à entraîner une activation, c'est la *nature* du complexe formé qui intervient en premier chef. Nous savons que le mécanisme d'activation par les ions métalliques résulte de la « fragilisation » d'une liaison *labile* par suite de déplacements électroniques provoqués par la présence des ions métalliques.

ne sont pas du type $\begin{array}{ccc} & \text{O} & \\ & \diagdown \quad \diagup & \\ \text{P} & & \text{M} \\ & \diagup \quad \diagdown & \\ & \text{O} & \end{array}$ mais ont pour formule :



Il reste à expliquer alors pourquoi les ions métalliques tels que Mg^{++} , Ca^{++} ou Zn^{++} activent l'hydrolyse enzymatique des esters phosphoriques par les phosphatases. D'après Frédéricq [28] l'action du métal est double : favoriser la formation du complexe enzyme-substrat grâce à

l'affinité du métal pour la liaison phosphorique, polariser cette liaison en favorisant ainsi l'attaque de l'atome de phosphore par les ions hydroxyles ou par l'eau.

VIII. — HYDROLYSE EN PRÉSENCE D'IONS La^{+++} et Ce^{+++} .

A) Introduction

L'activation de l'hydrolyse des monoesters orthophosphoriques par les gels d'hydroxydes de terres rares a été signalée par Bamann et Meisenheimer [4] pour l' α -glycérophosphate entre pH 8 et 10. La grande stabilité des esters phosphoriques en milieu alcalin est due à la charge négative du groupe PO_3^- qui exerce une répulsion sur les ions hydroxyles, empêchant ainsi l'hydrolyse. Westheimer [68] pense que lorsque l'ester est adsorbé sur le gel d'hydroxyde polyvalent, la charge négative est neutralisée par le cation, et les ions OH^- ou l'eau peuvent alors approcher du site réactionnel, c'est-à-dire de l'atome de phosphore.

L'activation de l'hydrolyse des dérivés phosphorés par les lanthanides est générale et leur action s'exerce sur les phosphoramides [6], les esters de sucres [7], les coenzymes [9], les phosphoprotéines [5], etc... Les réactions se font en général en solutions faiblement alcalines et à basse température.

L'hydrolyse des monoesters, toutefois, n'est activée que si ces esters sont substitués en position β par rapport à la fonction phosphorique [15]. L'hydrolyse de l'éthylphosphate n'est que faiblement activée par le gel d'hydroxyde de lanthane [68]. L'activation diminue lorsque la longueur de la chaîne carbonée augmente.

B) Conditions expérimentales

Nous examinons l'action de La III et Ce III sur l'hydrolyse de la PC.

La température d'expérience est fixée à $80^\circ \pm 0,1^\circ \text{C}$ et les hydrolyses sont réalisées à des concentrations équimoléculaires de PC et d'ions métalliques. Certaines expériences ont été conduites en l'absence de systèmes tampons, d'autres en présence d'un tampon $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$.

C) Hydrolyse en présence de La III .

1° Milieu hétérogène.

A 25 ml d'une solution de PC 0,2M, nous ajoutons successivement 25 ml d'une solution de nitrate de lanthane 0,2M, 11 ml de soude N et nous complétons à 100 ml à l'aide d'eau distillée.

Le système obtenu est hétérogène, il présente un trouble blanc opalescent, son pH est voisin de 9,0.

La solution répartie en ampoules scellées est soumise à une hydrolyse à $80^{\circ} \pm 0,1^{\circ} \text{ C}$. D'autre part, une autre ampoule est maintenue pendant 24 heures à 100° C afin d'observer l'évolution du pH. On constate qu'au bout de ce temps il est passé de 9,0 à 11,1, pour un taux d'hydrolyse de 87,5 %, de plus on observe dans la solution un gros précipité blanc de phosphate de lanthane.

Les solutions hydrolysées à 80° C sont dosées par attaque manganique alcaline.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Hydrolyse à 80° C de la PC en présence d'ions La^{+++} .

Durée d'hydrolyse	1 H	2 H	4 H	8 H	14 H	20 H
Pourcentage	7,4	11,6	22,8	34,2	57,8	76,4

Cette expérience met nettement en évidence une activation de l'hydrolyse de la PC en présence d'hydroxyde de lanthane. On observe des taux d'hydrolyse élevés pour des durées d'hydrolyse et une température auxquelles, habituellement, la PC n'est pas hydrolysée.

2° Milieu homogène.

A pH 8,6 (pH 6,2 après 24 heures à 100° C), en solution parfaitement limpide, nous obtenons dans les mêmes conditions les résultats suivants :

Hydrolyse à 80° C de la PC en présence d'ions La^{+++} .

Durée d'hydrolyse	1 H	2 H	4 H	8 H	16 H
Pourcentage	8,4	17,1	24,4	36,0	82,7

Comme dans le cas précédent, nous observons une activation importante. Il est intéressant de remarquer que l'on observe dans ce cas une activation même en l'absence apparente d'hydroxyde de lanthane.

D) Hydrolyse en présence de Ce III

Nous avons signalé, lors de l'étude des courbes de titrage de la PC en présence d'ions Ce^{+++} , que l'addition de soude s'accompagne d'abord

de l'apparition d'un précipité d'hydroxyde, celui-ci se redissout rapidement pour laisser place à une coloration brune dans la solution, en même temps que l'on observe une légère diminution de pH.

Comme dans le cas des ions La^{+++} , nous avons étudié l'hydrolyse en présence d'ions Ce^{+++} en milieu homogène à pH neutre, ainsi qu'en milieu hétérogène à pH faiblement alcalin.

1° Milieu hétérogène.

A 25 ml de PC 0,16M nous ajoutons 25 ml d'une solution 0,16M de nitrate de cérium, 25 ml de tampon ammoniacal, 15 ml de soude normale et nous complétons le volume à 100 ml avec de l'eau distillée.

Nous obtenons un système hétérogène dont le pH passe de 8,9 à 8,75, après 16 heures de chauffage à 100° C.

Nous l'hydrolysons à $80^\circ \pm 0,1^\circ \text{C}$ pendant des temps variables. Nous obtenons les résultats suivants :

Hydrolyse à 80°C de la PC en présence d'ions Ce^{+++}
pH = 8,8.

Durée d'hydrolyse Pourcentage	1 H 9,5	2 H 16,9	6 H 30,9	14 H 44,9
----------------------------------	------------	-------------	-------------	--------------

Comme dans le cas précédent, nous observons une nette activation de la réaction par rapport à la même réaction réalisée au même pH à 100°C en absence d'ions Ce^{+++} .

2° Milieu homogène.

A 25 ml de PC 0,16M nous ajoutons 25 ml d'une solution de nitrate de cérium 0,16M et 50 ml de tampon ammoniacal. Nous obtenons une solution limpide incolore. Au bout de quelques heures nous constatons que la solution a pris la coloration brune signalée tout en demeurant parfaitement limpide. Son pH est égal à 7,5 et devient égal à 4,4 après 64 heures à 100°C .

Nous hydrolysons cette solution à $80^\circ \pm 0,1^\circ \text{C}$ pendant des temps variables. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Hydrolyse à 80°C de la PC en présence d'ions Ce^{+++} .

Durée d'hydrolyse Pourcentage	2 H 14,3	4 H 25,9	8 H 44,1	16 H 30 74,5
----------------------------------	-------------	-------------	-------------	-----------------

Comme dans le cas du lanthane, nous observons une activation de l'hydrolyse en l'absence de tout précipité de gel d'hydroxyde.

Les mécanismes proposés pour expliquer l'action des gels d'hydroxydes de terres rares font intervenir l'hydroxyde complexe $M(OH)^{2+}$ [10, 15] et leur effet est attribué aux propriétés adsorbantes des gels.

Nous avons réalisé des tentatives d'hydrolyses de la PC en présence des hydroxydes de magnésium, calcium, beryllium, baryum et fer (ferrique). Dans aucun cas nous n'avons observé une activation de l'hydrolyse par ces ions.

Dans le cas des ions Mg^{++} , Ca^{++} et Ba^{++} nous avons obtenu des taux d'hydrolyse notables en opérant à l'autoclave sous 2 kg/cm² (133° C).

Les taux observés étaient toujours supérieurs à ceux obtenus en présence de NaOH ou KOH, ce qui indique quand même que l'hydrolyse s'est trouvée favorisée par la présence de ces ions.

On ne s'explique pas pourquoi les ions Fe^{+++} , qui donnent un complexe $Fe(OH)^{2+}$ comme La III et Ce III [69] et dont les propriétés adsorbantes sont connues, n'activent pas l'hydrolyse de la PC.

Il semble donc que les faits observés résultent essentiellement de propriétés spécifiques des hydroxydes de terres rares.

Nous avons constaté qu'en milieu acide, à pH 1,3, les ions Ce^{+++} en concentration 0,05M n'ont aucune influence sur la vitesse d'hydrolyse de la PC. Par contre, les ions Ce^{++++} qui précipitent à l'état d'hydroxyde dès pH 0,8 activent l'hydrolyse en milieu acide (pH 1,1) et en milieu alcalin (pH 9,7).

Hydrolyse à 80° C de la PC en présence d'ions Ce^{++++} .

a) pH = 1,1.

Durée d'hydrolyse	1 H	2 H	4 H	6 H	8 H
Pourcentage	13,5	23,4	38,4	51,8	64,6

b) pH = 9,7.

Durée d'hydrolyse	1 H	2 H	3 H	24 H
Pourcentage	24,0	31,3	34,7	48,5

Ceci montre que la présence de l'hydroxyde de terre rare, sous une certaine forme, est nécessaire à l'activation de l'hydrolyse. C'est son aptitude

à former des complexes avec la forme di-ionisée de l'ester qui le rend capable de réaliser l'hydrolyse de cette forme ionique remarquablement stable par ailleurs.

IX. — CONCLUSIONS.

L'étude de l'influence de différents ions métalliques sur l'hydrolyse de la PC nous a montré que nous observons trois effets distincts suivant les ions métalliques utilisés.

1° La courbe d'hydrolyse en fonction du pH est décalée vers les pH acides et l'on observe une légère diminution de la vitesse maximum d'hydrolyse. Le décalage correspond sensiblement à l'abaissement de la courbe de titrage de la PC provoqué par la présence des ions métalliques, cet abaissement résultant en majeure partie de la formation de complexes. Les ions présentant cet effet sont Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} .

2° L'hydrolyse est fortement inhibée par la présence des ions Be^{++} , Al^{+++} et Fe^{+++} . L'effet observé est le même que celui exercé généralement par ces ions sur l'hydrolyse enzymatique.

3° L'hydrolyse est fortement activée en milieu neutre ou faiblement alcalin par les ions La^{+++} et Ce^{+++} . En milieu acide les ions Ce^{+++} n'exercent aucune influence, par contre les ions Ce^{++++} qui existent à l'état d'hydroxyde dès pH 0,8 activent l'hydrolyse en milieu acide.

CONCLUSIONS

Les conclusions de ce travail peuvent se résumer comme suit :

L'étude de la cinétique d'hydrolyse de la phosphorylcholine nous a montré que la réaction est du premier ordre par rapport à l'ester. Le profil de la courbe des vitesses d'hydrolyse en fonction du pH est celui de la plupart des monoesters orthophosphoriques d'alcools. La vitesse d'hydrolyse passe par un minimum vers pH 0,5, elle présente un maximum vers pH 4 et s'annule en milieu alcalin à partir de pH 8 environ.

La vitesse d'hydrolyse des formes mono-ionisée et di-ionisée est nulle ou très faible.

Entre pH 2 et pH 8 environ, la vitesse semble résulter exclusivement de l'hydrolyse de la forme mono-ionisée $^+N(CH_3)_3CH_2CH_2OPO_3H^-$, c'est-à-dire de la forme dipolaire. La constante de vitesse entre ces deux valeurs de pH est proportionnelle à la concentration de cette forme ionique. En dessous de pH 2 environ, cette proportionnalité n'existe plus et l'hydrolyse peut résulter alors de la réaction d'une forme acide conjuguée dont la vitesse serait notable, ce qui permet d'expliquer le minimum observé à pH 0,5.

La stabilité de la phosphorylcholine à l'hydrolyse ne résulte pas de sa structure « bétainique » mais des propriétés générales des esters phosphoriques.

L'hydrolyse en présence d'ions métalliques présente trois aspects :

1° Dans le cas des ions Mg^{++} , Ca^{++} et Zn^{++} , le profil de la courbe des vitesses d'hydrolyse en présence de ces ions métalliques est le même qu'en leur absence, mais ces courbes sont décalées vers les pH acides. Ce décalage est sensiblement égal au déplacement de pH des courbes de dissociation de la phosphorylcholine en présence de ces ions aux mêmes concentrations. Ce déplacement est en partie dû à la formation de complexes entre la phosphorylcholine et ces ions métalliques.

2° Un second groupe d'ions métalliques qui présentent un net effet inhibiteur sur l'hydrolyse est constitué par les ions Be^{++} , Al^{+++} et Fe^{+++} .

3° Les ions métalliques de la série des terres rares sont des activateurs de l'hydrolyse en milieu neutre ou faiblement alcalin (La^{+++} et Ce^{+++}), ou

même en milieu acide (Ce^{++++}). Ces propriétés semblent appartenir spécifiquement aux hydroxydes de terres rares, qui sont les seuls à provoquer l'hydrolyse de la forme di-ionisée.

L'étude des courbes de titrage de la phosphorylcholine nous a permis de déterminer les constantes de dissociation de cet acide. Ces constantes de dissociation sont plus grandes que les constantes de dissociation correspondantes de l'acide orthophosphorique. La charge positive de la partie cholinique de la molécule permet d'expliquer sa plus grande acidité (pK_2) par rapport à la plupart des esters phosphoriques.

L'étude des courbes de titrage en présence d'ions métalliques nous a permis d'établir l'existence de complexes de la phosphorylcholine avec divers ions métalliques.

Dans le cas des ions Mg^{++} , Ca^{++} et Zn^{++} ces complexes comprennent une molécule de phosphorylcholine pour un ion métallique, et sont formés avec la forme di-ionisée de l'ester.

La phosphorylcholine ne semble pas posséder une structure bétaïnique, elle serait plus simplement une molécule dipolaire, comme nous l'ont montré quelques critères expérimentaux: pH des solutions d'acide libre, chromatographie par échange d'ions etc.

En conclusion, l'hydrolyse de la phosphorylcholine se déroule comme celle de la plupart des esters phosphoriques. La vitesse d'hydrolyse est réglée, sauf en milieu fortement acide, par la concentration de la forme mono-ionisée.

Les ions métalliques ont des influences diverses sur la vitesse d'hydrolyse.

Seuls les ions de terres rares sont susceptibles de provoquer l'hydrolyse de la forme di-ionisée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AKERFELDT S. — *Acta Chem. scand.* 17 (1963) 319.
- [2] BAER E. et Mac ARTHUR C. — *J. biol. Chem.* 154 (1944) 451.
- [3] BAILLY M.-C. — Thèse Paris (1941).
- [4] BAMANN E. et MEISENHEIMER M. — *Ber* 71 (1938) 1711.
- [5] BAMANN E., TRAPMANN H. et SCHUEGRAF A. — *Ber.* 88 (1955) 1726.
- [6] BAMANN E., FERNANDEZ L. et TRAPMANN H. — *Ber.* 88 (1955) 1846.
- [7] BAMANN E. et TRAPMANN H. — *Biochem. Z.* 326 (1955) 161.
- [8] BAMANN E., RIEHL J. et VICOLAI R. — *Biochem. Z.* 328 (1956) 12.
- [9] BAMANN E. et TRAPMANN H. — *Arch. Pharm.* 289 (1956) 338.
- [10] BAMANN E. et TRAPMANN H. — *Advan. Enzymol.* 21 (1959) 169.
- [11] BEZNAK A.B.L. et CHAIN E. — *Quart. J. exper. Physiol.* 26 (1936) 201.
- [12] BRANCH C.E.K. et CALVIN M. — *Theory of organic Chemistry*, Chapitre VI, Prentice Hall N.Y. (1941).
- [13] BUCHER T. — *Biochim. Biophys. Acta* 1 (1947) 292.
- [14] BUNTON C.A., LLEWELLYN D.R., OLDHAM K.G. et VERNON C.A. — *J. chem. Soc.* (1958) 3574.
- [15] BUTCHER W. W. et WESTHEIMER F.H. — *J. amer. chem. Soc.* 77 (1955) 2420.
- [16] CANNAN K. et KIBRICK A. C. — *J. amer. chem. Soc.* 60 (1938) 2314.
- [17] CHANLEY J.D., GINDLER G.M. et SOBOTKA K. — *J. amer. chem. Soc.* 74 (1952) 4347.
- [18] CHANLEY J.D. et GINDLER E.M. — *J. amer. chem. Soc.* 75 (1953) 4035.
- [19] CHANLEY J.D. et FEAGESON E. — *J. amer. chem. Soc.* 77 (1955) 4002.
- [20] CHERBULIEZ E., PROBST H., RABINOWITZ J. et SANDRIN S. — *Helv. chim. Acta* 41 (1958) 1163.
- [21] CHERBULIEZ E., GANDILLON C., de PICCIOTTO A. et RABINOWITZ J. — *Helv. chim. Acta* 42 (1959) 2277.
- [22] COTTE J. et KAHANE E. — *Bull. Soc. chim.* 17 (1950) 639.
- [23] DAWSON R.M.C. — *Comparative Biochemistry* par FLORKIN M. et MASON H.S., volume III, Academic Press (1962), page 265.
- [24] DESJOBERT A. — Thèse, Paris (1951).
- [25] EDSALL J.T. et WYMAN J. — *Biophysical Chemistry*, Volume I, Academic Press (1958), page 471.
- [26] EICHHORN G.L. — *Feder. Proc.* 20 (1961) supp. N° 10 page 40.
- [27] FISCHGOLD H. et CHAIN E. — *Proc. Roy. Soc. B* 117 page 239.
- [28] FREDERICQ E. — *Ind. chim. Belg.* (1960) n° 5 page 511.
- [29] GINODMAN L.M. — *Biokhimiya* 19 (1954) 666.
- [30] GLASSTONE S., LAIDLER K.J. et EYRING H. — *The theory of rate processes*, Mc Graw and Hill N.Y. (1941), page 427.
- [31] GREENWALD I., REDISH J. et KIBRICK A.C. — *J. biol. Chem.* 135 (1940) 65.
- [32] KAHANE E. — *J. Pharm. Chim.* 19 (1934) 26.
- [33] KAHANE E. et KAHANE M. — *Bull. Soc. chim.* 15 (1948) 1211.
- [34] KAY H.D. — *Biochem. J.* 22 (1928) 855.
- [35] KIESSLING W. — *Biochem. E.* 273 (1934) 103.
- [36] KLOTZ I.M. et LOH-MING W.C. — *J. amer. chem. Soc.* 76 (1954) 805.
- [37] KOSHLAND D.E. Jr. — *J. amer. chem. Soc.* 74 (1952) 2286.
- [38] KUHN R., HAUSSEER I. et BRYDOWNA W. — *Ber.* 68 (1935) 2386.

- [39] KUMLER W.D. et EILER J.J. — J. amer. chem. Soc. 65 (1943) 2355.
- [40] LANFORD O.E. et KIEHL S.J. — J. amer. chem. Soc. 64 (1942) 291.
- [41] LAPIDOT A. et SAMUEL D. — Biochim. Biophys. Acta, 65 (1962) 164.
- [42] LAPIDOT A., SAMUEL D. et SILVER B. — Chem. and Ind. (1963) page 468.
- [43] LEHMANN H. — Biochem. Z. 286 (1935) 336.
- [44] LEHNINGER A.L. — Physiol. Rev. — 30 (1950) 393.
- [45] LIEBECQ C. et JACQUEMOTTE-LOUIS M. — Bull. Soc. Chim. biol. 40 (1958) 67.
- [46] LIPMANN F. — Advan. Enzymol. 1 (1941) 99.
- [47] LIPMANN F. — Advan. Enzymol. 6 (1946) 243.
- [48] MACHEBŒUF M. et DELSAL J. — Bull. Soc. Chim. biol. 25 (1943) 116.
- [49] MARTELL A.E. et SCHWARZENBACH G. — Helv. Chim. Acta, 39 (1956) 653.
- [50] MEYERHOF O. — Ann. N.Y. Acad. Sc. 45 (1944) 377.
- [51] MEYERHOF O. et OESPER P. — J. Biol. Chem., 179 (1949) 1371.
- [52] NAJJAR V.A. — *Phosphorus Metabolism* vol. 1, The John Hopkins Press, Baltimore (1951), page 500.
- [53] OESPER P. — Ibid p. 523.
- [54] PLIMMER R. et BURCH W. — Biochem. J. 31 (1937) 398.
- [55] RAUEN H.M. — *Biochemisches Taschenbuch*, Springer Verlag (1956), page 649.
- [56] RILEY R.F. — J. Biol. chem. 153 (1944) 535.
- [57] ROBINSON R.A. et STOKES R.H. — *Electrolyte solutions*, Butterworths, Londres (1959), page 19.
- [58] SAMUEL D. et SILVER B.L. — J. chem. Soc. (1963) page 289.
- [59] SCHMIDT G. et LASKOWSKI M. — *The Enzymes* par BOYER P.D., LARDY H. et MYRBACK K., volume 5, Academic Press (1961), page 3.
- [60] SMITH R.M. et ALBERTY R.A. — J. Phys. Chem., 60 (1956) 180.
- [61] SMITH R.M. et ALBERTY R.A. — J. amer. Chem. Soc. 78 (1956) 2376.
- [62] STENE S. — Rec. Trav. chim. Pays-Bas, 49 (1930) 1133.
- [63] STRICKLAND K.P., THOMPSON R.M.S. et WEBSTER G.R. — Arch. Biochem. Biophys. 64 (1956) 498.
- [64] SWOBODA P.A.T. et CROOK E.M. — Biochem. J. 59 (1955) XXIV.
- [65] VAN WAZER J.R. et CALLIS C.F. — Chem. Rev., 58 (1958) 1011.
- [66] VAN WAZER J.R. — *Acides ribonucléiques et polyphosphates*, C.N.R.S. (1962), page 513.
- [67] VERNON C.A. — Chemical Society, London, special publication n° 8 (1957), page 17.
- [68] WESTHEIMER F.H. — Trans. N.Y. Acad. Sc., 18 (1955) 15.
- [69] YATSIMIRSKII K.B. et VASIL'EV V.P. — *Instability constants of complex compounds* Pergamon Press (1960), page 513.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

LA DIFFUSION DANS LES SEMI-CONDUCTEURS

VU et approuvé

Montpellier, le 30 Novembre 1963

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

B. CHARLES

Vu et permis d'imprimer

Montpellier, le 4 Décembre 1963

Le Recteur de l'Académie de Montpellier,

G. RICHARD

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	9
PREMIÈRE PARTIE. Généralités	13
CHAPITRE PREMIER. — L'hydrolyse des esters phosphoriques ...	15
I. Influence du pH	15
II. Liaisons rompues	16
III. Mécanismes de réaction	17
IV. Énergie des liaisons	20
CHAPITRE II. — Techniques expérimentales	23
I. Produits étudiés	23
II. Préparation de l'acide choline-phosphorique en solution	24
III. Préparation du sel de sodium en solution	26
IV. Méthodes analytiques	27
DEUXIÈME PARTIE. — Dissociation de la phosphorylcholine ..	31
CHAPITRE PREMIER. — Courbe de titrage de la phosphorylcholine	33
I. Partie expérimentale	33
II. Partie théorique	34
III. Résultats expérimentaux	37
IV. Discussion	39
V. Influence de la constante diélectrique du milieu	40
VI. Courbe de titrage de la solution hydrolysée	41
VII. Résumé	42
CHAPITRE II. — Courbes de titrage en présence d'ions métalliques	43
I. Constantes de stabilité des complexes	43
II. Courbes de titrage des sels de PC	46
A) Courbes de titrage en présence d'ions Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} , Ba^{++} et Na^{+}	48
B) Courbes de titrage en présence d'ions Be^{++} , Fe^{+++} , Al^{+++} , La^{+++} et Ce^{+++}	53
III. Discussion	57

TROISIÈME PARTIE. — Hydrolyse de la phosphorylcholine	59
CHAPITRE PREMIER. — Cinétique d'hydrolyse de la phosphorylcholine	61
I. Introduction	61
II. Conditions expérimentales	62
III. Étude cinétique	64
IV. Résultats expérimentaux	66
V. Influence de la température	71
VI. Conclusions	76
CHAPITRE II. — Hydrolyse en présence d'ions métalliques	77
I. Introduction	77
II. Hydrolyse en présence d'ions Mg^{++}	78
III. Hydrolyse en présence d'ions Zn^{++}	80
IV. Hydrolyse en présence d'ions Ca^{++}	82
V. Hydrolyse en présence d'ions Be^{++}	82
VI. Hydrolyse en présence d'ions Fe^{+++} et Al^{+++}	83
VII. Discussion	84
VIII. Hydrolyse en présence d'ions La^{+++} et Ce^{+++}	87
IX. Conclusions	91
CONCLUSIONS	93
BIBLIOGRAPHIE	95

Imp. Occitane - Montpellier